Produits Elucigene® Male Factor Infertility

Mode d'emploi

Produit	Taille	Code du catalogue
Elucigene Male Factor Infertility	25 tests	AZFXYB1
Elucigene MFI-Y*plus*	10 tests	AZFPLBX

IVD Utilisation pour diagnostic in vitro

Fabriqué par :
Elucigene Diagnostics
Citylabs
Nelson Street
Manchester
M13 9NQ

Pour joindre le service des ventes, le service clients et le service technique :
T : +44 (0) 161 669 8122
F : +44 (0) 161 669 8129
E-mail : enquiries@elucigene.com
E-mail : techsupport@elucigene.com

Elucigene Diagnostics est le nom commercial de Delta Diagnostics (UK) Limited., une société enregistrée en Angleterre et au Pays de Galles, sous le numéro 8696299.

Elucigene Male Factor Infertility

La gamme de produits Elucigene Male Factor Infertility se compose d'essais reposant sur de l'ADN multiplexé visant à déterminer rapidement le statut d'aneuploïdie des chromosomes sexuels, ainsi qu'à détecter et caractériser les trois catégories de microdélétion du chromosome Y les plus communes associées à l'infertilité masculine. Les kits Elucigene Male Factor Infertility sont disponibles dans les formats énumérés ci-dessous. Pour plus d'informations sur les kits de la gamme Male Factor Infertiliy, visitez notre site :

http://www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

Usage prévu

Male Factor Infertility

Pour le diagnostic quantitatif in-vitro de routine des aneuploïdies des chromosomes sexuels les plus communes (p. ex. syndrôme de Klinefelter) et des microdélétions du chromosome Y (AZFa, AZFb et AZFc) couramment associées à l'infertilité masculine. L'essai comprend les marqueurs STR des chromosomes sexuels XHPRT et DXYS18 ainsi que les marqueurs non STR AMEL, TAF9L et SRY pour déterminer le statut d'aneuploïdie des chromosomes sexuels. L'essai comprend également les marqueurs spécifiques du chromosome Y sY84, sY86, sY127, sY134, sY254 et sY255 pour la détection des microdélétions du chromosome Y des régions AZFa, AZFb et AZFc loci. La méthode employée par le kit Elucigene Male Factor Infertility est la technique de réaction en chaîne par polymérase-fluorescence quantitative (QF-PCR, Quantitative Fluorescence-Polymerase Chain Reaction). Les dispositifs sont destinés à l'utilisation sur un ADN extrait du sang total (EDTA) et ne doivent pas servir pour d'autres matrices de test. La population cible est composée de patients masculins chez lesquels une infertilité est suspectée et qui sont susceptibles de présenter des caractéristiques associées, comme une faible numération de spermatozoïdes. Le dispositif est destiné à l'utilisation combinée avec d'autres procédures de diagnostic pour étayer ou infirmer le diagnostic clinique proposé. Le dispositif est destiné à un usage professionnel exclusivement en milieu de laboratoire moléculaire ou cytogénétique.

Male Factor Infertility-Yplus (MFI-Yplus)

Kit complémentaire contenant des marqueurs du chromosome Y supplémentaires à utiliser en combinaison avec Male Factor Infertility pour la caractérisation in-vitro de routine des trois microdélétions du chromosome Y les plus couramment associées à l'infertilité masculine. Ce kit est disponible pour l'analyse approfondie et la caractérisation des microdélétions du chromosome Y détectées en utilisant le kit Male Factor Infertility. La méthode employée par le kit Elucigene Male Factor Infertility est la technique de réaction en chaîne par polymérase-fluorescence quantitative (QF-PCR, Quantitative Fluorescence-Polymerase Chain Reaction). Les dispositifs sont destinés à l'utilisation sur un ADN extrait du sang total (EDTA), ils ne doivent pas servir pour d'autres matrices de test. La population cible est composée de patients masculins chez lesquels une infertilité est suspectée et testés positifs pour une microdélétion du chromosome Y. Le dispositif est destiné à l'utilisation combinée avec d'autres procédures de diagnostic pour étayer ou infirmer le diagnostic clinique proposé. Le dispositif est destiné à un usage professionnel exclusivement en milieu de laboratoire moléculaire ou cytogénétique.

Résumé et explication

Statistiquement, 10-15 % des couples ont des difficultés à concevoir un enfant, l'infertilité masculine, p. ex. faible nombre de spermatozoïdes, étant une cause sous-jacente dans environ 50 % des cas. Bien que l'infertilité masculine soit le plus souvent d'origine inconnue, des études ont démontré que l'aneuploïdie des chromosomes sexuels et les microdélétions des régions spécifiques du chromosome Y peuvent jouer un rôle (1).

Le syndrome de Klinefelter est l'aneuploïdie des chromosomes sexuels la plus fréquemment associée à l'infertilité masculine. La prévalence de ce syndrome est de 1:500 à 1:650 nouveaux-nés de sexe masculin. Le plus souvent, la cause en est la présence d'une copie supplémentaire du chromosome X (caryotype 47, XXY), cette mutation étant le défaut génétique le plus fréquemment observé dans l'infertilité masculine. Les microdélétions du chromosome Y sont la deuxième cause génétique d'infertilité masculine la plus fréquente (2), elles sont caractérisées par la présence de microdélétions dans trois régions (AZFa, AZFb, AZFc) détectées dans jusqu'à 7% des cas d'oligospermie (faible numération de spermatozoïdes) et 13 % des azoospermies non-obstructives (absence de spermatozoïdes) (1). Ces microdélétions sont dues à la recombinaison homologue de séquences répétitives dans ces régions et les mécanismes moléculaires exacts et les événements de recombinaison à l'origine de ces mutations ont été élucidés. Ces régions sont situées sur le chromosome yq11 et bien que la région de microdélétion AZFa soit distincte, il y a un haut degré de chevauchement entre les régions affectées par la microdélétion AZFb et AZFc (figure 1).

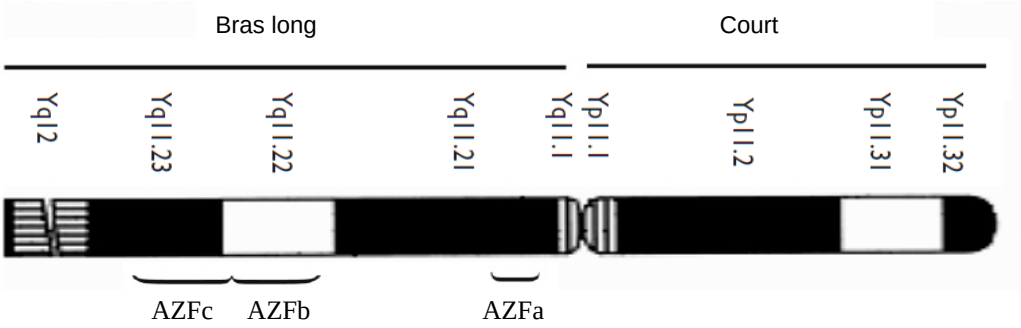


Figure 1 : Localisation chromosomique des régions de microdélétion AZFa, AZFb et AZFc sur chromosome Y (Poongothai et al., 2009).

L'identification des causes génétiques de l'infertilité masculine peut aboutir à une gestion clinique plus efficace des patients. Par exemple, les patients chez lesquels une microdélétion de la région AZFc a été observée (la plus commune) présentent un phénotype variable (tributaire du bagage génétique). Cependant, d'une manière générale, ces patients affichent des niveaux résiduels de spermatogenèse et, dans ces cas, les chances de récupérer des spermatozoïdes par TESE (extraction testiculaire de sperme) sont de 50 %. Les couples affectés par des microdélétions AZFc peuvent être en mesure de concevoir un enfant en recourant aux techniques de procréation assistée comme l'ICSI (injection intracytoplasmique de spermatozoïdes). Cette situation contraste avec celle des patients présentant des microdélétions complètes dans les régions AZFa, AZFb et AZFc pour lesquels une récupération réussie de sperme fonctionnel est improbable (2), bien que la probabilité augmente si la délétion n'est pas complète (voir la figure 2).

Principes de la procédure

La méthode employée par la gamme de produits Elucigene Male Factor Infertility pour produire un essai multiplexé détectant l'aneuploïdie des chromosomes X et Y (Male Factor Infertility) ainsi que les microdélétions du chromosome Y (Male Factor Infertility et MFI-Yplus) est la technique de réaction en chaîne par polymérase-fluorescence quantitative (Quantitative Fluorescence-Polymerase Chain Reaction) technique (3-7).

(i) Détection de l'aneuploïdie des chromosomes sexuels

En utilisant l'amplification par PCR, l'aneuploïdie chromosomique est détectée lorsque les amorces marquées par fluorescence ciblent des régions hautement polymorphiques de séquences d'ADN appelées STR (Short Tandem Repeat ou séquences brèves répétées en tandem) qui se situent sur les chromosomes d'intérêt. Chacun des marqueurs STR ciblés est spécifique au chromosome sur lequel il se trouve, donc le nombre de copies du marqueur STR peut indiquer le nombre de copies du chromosome. Des marqueurs STR informatifs présentant une forte hétérogénéité ont été sélectionnés, de manière à pouvoir facilement déterminer le nombre de copies où deux allèles d'un STR spécifique du chromosome sont déterminés par la technique QF-PCR sous forme de deux pics avec un rapport 1:1. La présence d'un allèle de STR supplémentaire sous la forme d'un ensemble de trois pics avec un rapport 1:1:1 ou un ensemble de deux pics avec un rapport 2:1 ou 1:2 est un diagnostic de la présence d'une séquence supplémentaire, qui peut à son tour représenter un chromosome supplémentaire.

(ii) Détection de la microdélétion du chromosome Y

En 2004, l'Académie Européenne d'Andrologie (EEA) et le Réseau européen d'assurance qualité en génétique moléculaire (EMQN) ont suggéré une série d'orientations concernant les meilleures pratiques pour les tests visant à détecter les microdélétions du chromosome Y en évaluant 2 marqueurs STS (sequence-tagged site) par PCR pour chaque région de délétion ; AZFa- sY84 et sY86, AZFb- sY127 et sY134 et AZFc- sY254 et sY255 (8). En 2014, ces orientations ont été modifiées pour inclure l'analyse approfondie en poursuivant la caractérisation et le dimensionnement des microdélétions de la région AZF détectées en utilisant un jeu de marqueurs définis séparément AZFa – sY82, sY1182, sY83 et sY88, AZFb – sY105, sY121, sY143 et sY153, AZFc (sous-type gr/gr) – sY1191 et sY1291 (2). La poursuite de la caractérisation des microdélétions de la région AZF est utile compte tenu de la plus grande probabilité d'obtenir un sperme fonctionnel chez les patients ayant des microdélétions partielles par rapport aux patients présentant une délétion complète d'une ou plusieurs de ces régions. Par exemple, la microdélétion gr/gr, une sous-délétion AZFc, est généralement associée à un phénotype plus modéré que celui observé dans les cas de délétions complètes. En effet, l'importance clinique de cette sous-délétion varie en fonction du bagage génétique, qui est considéré comme responsable d'un phénotype de sous-fertilité chez certaines populations et même considéré comme « fixe » chez certains hablotypes de chromosome Y fréquents au sein de la population japonaise sans incidence sur la numération de spermatozoïdes. Les amorces marquées par fluorescence spécifiques pour la séquence qui accompagnent ces marqueurs amplifient la séquence de type sauvage tandis que la perte du pic de diagnostic de type sauvage révèle une microdélétion couvrant ce marqueur STS.

Les produits amplifiés issus de la technique QF-PCR sont analysés de façon quantitative sur un Genetic Analyzer (Analyseur génétique) par électrophorèse capillaire pour déterminer à la fois le nombre de copies des marqueurs STR analysés et le statut de délétion des marqueurs STS du chromosome Y.

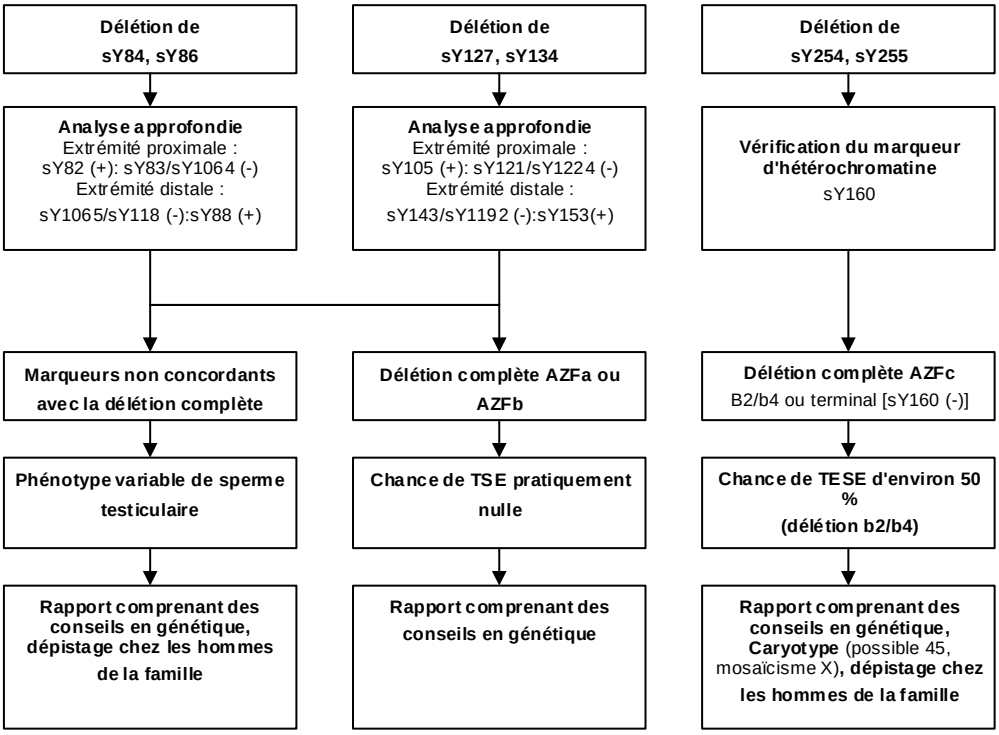

Délétion de sY84, sY86
Délétion de sY127, sY134
Délétion de sY254, sY255
Analyse approfondie Extrémité proximale : sY82 (+): sY83/sY1064 (-) Extrémité distale : sY1065/sY118 (-):sY88 (+)
Analyse approfondie Extrémité proximale : sY105 (+): sY121/sY1224 (-) Extrémité distale : sY143/sY1192 (-):sY153(+)
Vérification du marqueur d'hétérochromatine sY160
Marqueurs non concordants avec la délétion complète
Délétion complète AZFa ou AZFb
Délétion complète AZFc B2/b4 ou terminal [sY160 (-)]
Phénotype variable de sperme testiculaire
Chance de TSE pratiquement nulle
Chance de TESE d'environ 50 % (délétion b2/b4)
Rapport comprenant des conseils en génétique, dépistage chez les hommes de la famille
Rapport comprenant des conseils en génétique
Rapport comprenant des conseils en génétique, Caryotype (possible 45, mosaïcisme X), dépistage chez les hommes de la famille

Figure 2 : Diagramme présentant les conséquences cliniques de la découverte de chaque type de microdélétion de chromosome Y commune (Krausz et al., 2014).

Avertissements et précautions

1. Le contrôle ADN normal fourni avec les kits a été testé de manière indépendante et s'est avéré négatif pour le virus de l'hépatite B (VHB), le virus de l'hépatite C (VHC) et les virus de l'immuno-déficience humaine (VIH) 1 et 2.

2. Des précautions doivent être prises lors de la manipulation de matériel d'origine humaine. Tous les échantillons doivent être considérés comme potentiellement infectieux. Aucune méthode d'analyse ne peut garantir totalement l'absence du VHB, du VHC, du VIH ou d'autres agents infectieux.

3. La manipulation des échantillons et des composants du test, leur utilisation, leur conservation et leur élimination doivent respecter les procédures définies par les recommandations ou les réglementations nationales appropriées en matière de sécurité biologique.

4. Conformément aux bonnes pratiques de laboratoires actuelles, les laboratoires doivent traiter leurs propres échantillons internes de CQ de type connu avec chaque analyse, afin d'évaluer la validité de la procédure.

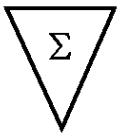
5. Si l'emballage du kit est endommagé, le contenu peut l'être aussi ; ne pas utiliser le kit et contacter le service clients.

Symboles utilisés sur les étiquettes

Les symboles utilisés sur l'ensemble des étiquettes et conditionnements respectent la norme harmonisée

ISO 15223

Fabricant



Nombre de tests

Voir le mode d'emploi

Conserver en dessous de la température indiquée

Utiliser avant la date indiquée

Code du catalogue

Numéro de lot ou de série

Dispositif médical de diagnostic in vitro

Matériel fourni

Kit Elucigene Male Factor Infertility

Chaque kit contient :

Elucigene Male Factor Infertility (TA) (Code de référence 450208) : 1 mélange réactif x 250 µl (25 tests), contenant des amorces pour amplifier les STR spécifiques des chromosomes X et Y (séquence courte répétée en tandem) et les marqueurs non-STR ainsi que les marqueurs de microdélétion du chromosome Y. Voir l'annexe 2 pour les détails sur les marqueurs de chaque kit. Le mélange réactif contient également de l'ADN-polymérase et des désoxynucléotides triphosphates dans un tampon.

Contrôle ADN (DC) (Code de référence 404489) : 1 fiole x 50 µl de contrôle ADN, normal pour les marqueurs de détection de l'aneuploïdie des chromosomes sexuels et pour les marqueurs de délétion du chromosome Y dans l'essai Elucigene Male Factor Infertity.

Kit Elucigene MFI-Y*plus*

Chaque kit contient :

Elucigene MFI-Y*plus* (TA) (Code de référence 450211) : 1 x 100 µl (10 tests) de mélange réactif, contenant des amorces pour amplifier les marqueurs de chromosome Y. Voir l'annexe 2 pour les détails sur les marqueurs de chaque kit. Le mélange réactif contient également de l'ADN-polymérase et des désoxynucléotides triphosphates dans un tampon.

Contrôle ADN (DC) (Code de référence 404489) : 1 fiole x 50µl de contrôle ADN, normal pour les marqueurs de délétion du chromosome Y dans l'essai Elucigene MFI-Y*plus*.

Préparation et conservation du kit

Après ouverture du kit, il est recommandé de distribuer le mélange réactif dans les flacons de PCR de 0,2 ml en volumes de 10 µl, et de les congeler à -20 °C. Il convient de s'assurer que le contenu des flacons est complètement décongelé et mélangé avant la distribution.

Le contrôle ADN doit être congelé à -20 °C.

Matériel nécessaire mais non fourni

Général

Consommables de laboratoire – gants ; tubes de microcentrifugation avec bouchons à vis ; flacons de PCR de 0,2 ml ou plaques de microtitration recommandés par le fabricant du thermocycleur utilisé ; embouts de pipette.

Équipement de laboratoire – pipettes de précision (2 jeux : 1 pour la manipulation pré-amplification et 1 pour la manipulation post-amplification ; pipettes à déplacement positif de préférence) ; vêtements de protection ; vortexeur ; micro-centrifugeuse ; centrifugeuse pour plaques de microtitration de 96 puits.

Amplification par PCR

Thermocycleur adapté pour des plaques de microtitration de 96 puits ou des flacons de 0,2 ml avec une précision de température de ± 1 °C dans la plage de 33 °C à 100 °C et une uniformité statique de température de ± 1 °C. Male Factor Infertility et MFI-Yplus ont été validés et leur conformité aux spécifications a été démontrée sur les plateformes de thermocycleur recommandées suivantes :

- Life Technologies GeneAmp 9700
- Life Technologies Veriti Dx (fonctionnant en mode standard)
- Life Technologies Veriti Dx (fonctionnant en mode simulation 9700)
- Life Technologies Proflex (fonctionnant en mode standard)
- Life Technologies Proflex (fonctionnant en mode simulation 9700)

Électrophorèse capillaire

Électrophorèse capillaire –Polymère POP-7 (ABI Cat No 4352759), 10x tampon analyseur génétique (ABI Cat No 402824) et formamide Hi-Di (ABI Cat No 4311320), GeneScan 600v2 LIZ marqueur de taille (ABI Cat No 4408399) et DS-33 (ensemble de fluorochromes G5) matrice standard (ABI Cat No 4345833).

Analyseurs génétiques Applied Biosystems ABI 3130 et 3500 (avec logiciel GeneMapper), rangée de capillaires de 36 cm (rangée de capillaires de 50 cm pour l'analyseur génétique 3500), plaques optiques de 96 puits, septas pour 96 puits, cassettes de 96 puits.

Analyse des données

L'un des progiciels d'analyse de données suivant est requis : GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems Inc.) ou version ultérieure ou GeneMarker 1.65 (SoftGenetics LLC) ou version ultérieure.

Documentation supplémentaire produit Elucigene Male Factor Infertility

Ce mode d'emploi inclut un paragraphe de base sur l'interprétation des résultats obtenus. Un Guide d'interprétation complémentaire pour les produits Elucigene Male Factor Infertility avec des exemples, un glossaire, ainsi qu'un Guide du logiciel d'analyse sont disponibles sur le site web d'Elucigene :

http://www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

Prélèvement et stockage d'échantillons

Les échantillons de sang total (EDTA) ont été évalués comme compatibles avec le présent test.

Il a été noté dans certains cas que les dispositifs de prélèvement d'échantillons ont endommagé la cohérence de certains analytes et peuvent interférer avec certaines procédures méthodologiques (9). Il est recommandé à chaque utilisateur de s'assurer que l'équipement choisi est utilisé conformément aux instructions du fabricant et que les dispositifs de prélèvements d'échantillons sont compatibles avec ce test.

Les échantillons sanguins doivent être conservés à -20°C avant la préparation de l'ADN. Éviter de congeler et décongeler à répétition.

Préparation de l'ADN à partir d'échantillons de sang total (EDTA)

Les résultats sont obtenus d'une manière constante avec l'ADN extrait en utilisant le QIAamp 96 DNA Blood Kit (ou le QIAamp DNA Mini Kit en utilisant la protéinase K) selon le protocole décrit dans le manuel QIAamp en commençant avec 200µl de liquide de sang total, puis en éluant avec 200µl d'eau de qualité biologie moléculaire.

Concentration de l'ADN

En appliquant les conditions PCR et les paramètres d'injection d'échantillons recommandés (voir la note dans la section Électrophorèse capillaire) spécifiés dans la colonne capillaire modules de série, des résultats acceptables sont obtenus de manière constante avec une quantité d'ADN de départ de 15 ng. Cependant, des résultats interprétables sont obtenus avec un intervalle d'ADN de départ de 5 ng à 30 ng.

La quantification de l'ADN est très importantee, la concentration de chaque échantillon d'ADN à tester doit être mesurée pour garantir des résultats optimaux. Des techniques telles que la fluorecence PicoGreen ou l'absorbance UV sont acceptables. Compte tenu de la variation des techniques de quantification ADN, l'utilisateur devrait tenir compte des recommandations suivantes :

Des quantités d'ADN de départ très élevées augmentent la probabilité que les pics de bruit de fond soient étiquetés par le logiciel d'analyse. Les mesures suivantes peuvent être prises afin de réduire la probabilité que les pics de bruit de fond soient étiquetés.

- Diluer, puis réamplifier l'échantillon d'ADN.
- Réduire le temps d'injection – voir la section Électrophorèse capillaire.
- Augmenter le seuil minimum d'amplitude de pics – voir le guide du logiciel d'analyse Elucigene CF-EU2v1.

Des quantités d'ADN de départ basses augmentent la probabilité que les pics de diagnostic soient faibles et ne soient pas étiquetés par le logiciel d'analyse. Les mesures suivantes peuvent être prises afin d'augmenter le signal.

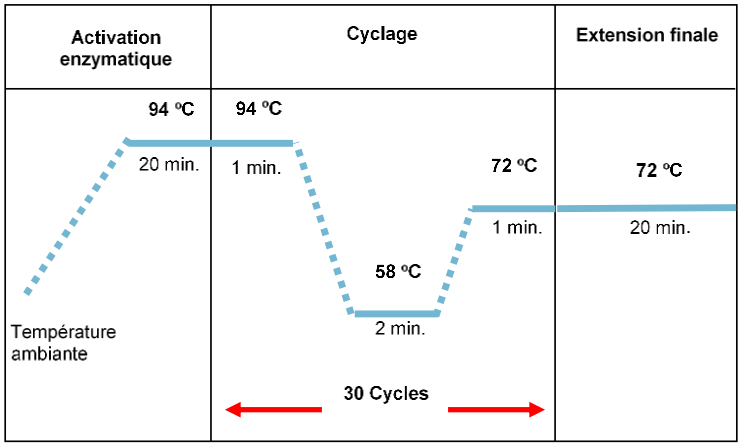
- Augmenter le temps d'injection – voir la section Électrophorèse capillaire.
- Réextraire l'échantillon et éluer avec un volume d'eau réduit (50µl).

Protocole de test

Procédure d'amplification

Remarque : *afin de minimiser le risque de contamination, les étapes 3 à 5 doivent être réalisées dans une zone exempte d'ADN. Des mesures doivent aussi être prises pour éviter la contamination avec un produit PCR.*

1. Programmer le thermocycleur pour un cycle à étape unique afin d'activer l'ADN polymérase à 94°C pendant 20 minutes, relié à un programme cyclique d'amplification de 1 minute à 94°C (dénaturation), 2 minutes à 58°C (recuit) et 1 minute à 72 °C (extension) pendant 30 cycles. Cela peut être associé à un fichier retardé de 20 minutes à 72 °C (extension) pendant le cycle final.



2. Un contrôle négatif (eau) doit être inclus dans chaque série PCR. Il peut aussi être approprié d'inclure d'autres contrôles, par ex. contrôle positif homme normal (contrôle ADN fourni) et contrôle femme normale (ADN non fourni).

3. Décongeler suffisamment de flacons de mélange réactif produit Male Factor Infertility (Male Factor Infertility ou MFI-Yplus) pré-aliquoté pour le nombre d'échantillons et de contrôles à tester (consulter la remarque sous Matériel fourni) et centrifuger les flacons à 12 000 g pendant 10 secondes.

4. À l'aide d'embouts de pipette distincts, ajouter 2,5 µl de l'ADN de test dans un flacon d'échantillon contenant 10 µl de mélange réactif et mélanger par pipetage va-et-vient. Répéter pour tous les échantillons à tester.

5. Ne pas ajouter d'ADN au flacon de PCR pour le contrôle négatif ; remplacer par 2,5 µl d'eau distillée stérile.

6. Centrifuger brièvement les flacons jusqu'à ce que tout le liquide soit au fond de chaque flacon.

7. Placer fermement tous les flacons dans le bloc du thermocycleur. Lancer le programme d'activation à 94°C, suivi par le programme d'amplification (voir l'étape 1).

8. À la fin du programme d'amplification, les échantillons peuvent être conservés à température ambiante jusqu'au lendemain ou à 2-8 °C pendant une durée maximale de 7 jours avant leur analyse par électrophorèse capillaire.

Électrophorèse capillaire

Il est recommandé à chaque utilisateur de s'assurer que l'équipement choisi est utilisé conformément aux instructions du fabricant et qu'il est compatible avec ce test. Dans cette situation, les paramètres clés sont le polymère et la rangée de capillaires. Les conditions d'électrophorèse capillaire suivantes permettent d'obtenir des résultats optimaux sur un analyseur génétique ABI3130 ou ABI3500.

1. Mélanger 6,8 µl de marqueur de taille à 250 µl de formamide Hi-Di et agiter soigneusement (mélange suffisant pour 16 puits). Distribuer 15 µl du mélange dans le nombre requis de puits d'une plaque optique à 96 puits.

2. Ajouter 3 µl de produit PCR de l'échantillon de test au mélange de marqueur de taille (de l'étape 1) déjà distribué dans la plaque et mélanger en utilisant la pipette. Sceller la plaque.

3. Dénaturer le produit PCR distribué dans la plaque optique sur un thermocycleur avec les paramètres suivants : 94 °C pendant 3 minutes puis 4 °C pendant 30 secondes.

4. Centrifuger la plaque à 1 000 g pendant 10 secondes pour éliminer les bulles éventuelles des puits, puis charger sur l'analyseur génétique.

***Remarque** : *Il est essentiel que les puits inutilisés (c.-à-d. les puits dans lesquels aucun échantillon ADN n'est chargé) soient quand même chargés avec du formamide Hi-Di afin de s'assurer que les capillaires ne sèchent pas.*

Les paramètres d'injection de l'échantillon peuvent être modifiés pour s'adapter à la quantité d'amplicon produite pendant la réaction PCR qui peut varier en fonction de la quantité d'ADN génomique d'entrée ajoutée. Une quantité moins importante d'amplicon peut être appliquée à la colonne pour l'analyse en réduisant soit la durée soit le voltage de l'injection. Inversement, une quantité plus importante d'amplicon peut être appliquée à la colonne pour l'analyse en augmentant soit la durée soit le voltage de l'injection. Des échantillons précédemment amplifiés peuvent être ré-injectés plusieurs fois pour une nouvelle analyse.

Analyse des données après la PCR

ABI3130 GENETIC ANALYZER (ANALYSEUR GÉNÉTIQUE)

La gamme de produits Male Factor Infertiliy a été conçue pour être compatible avec le produit Elucigene CFEU2v1. Ainsi, les produits Male Factor Infertility peuvent être traités en utilisant les modules de série et les paramètres CFEU2v1 existants. Par ailleurs, un module de série Male Factor Infertility (MFI) séparé peut être créé par l'utilisateur comme suit.

Créer une fiche d'échantillon à l'aide du logiciel de collecte des données 3130 en utilisant les paramètres suivants :

• Nom de l'échantillon : doit être le même nom ou numéro spécifique de l'échantillon.

• Propriétaire de la série : sélectionner le propriétaire par défaut du laboratoire.

• Protocole de la série : MFI (contient le module de série MFI 3130)*.

****Remarque :*** *Il est nécessaire de créer un module de série détaillant les paramètres de l'instrument et de l'affecter ensuite à un protocole de série dans lequel l'ensemble de fluorochromes G5 a été sélectionné. Pour de plus amples informations sur la création de modules de série, veuillez consulter le manuel utilisateur de votre instrument.*

3130 RUN MODULE (MODULE DE SÉRIE)

POUR LE POLYMÈRE POP7

Module de capillaires de 36 cm : MFI

Créer le module de série MFI dans le Module Manager (Gestionnaire de modules) du logiciel de collecte de données 3130. S'assurer que les options suivantes sont sélectionnées :

- Type : Régulier
- Matrice : FragmentAnalysis36_POP7
- Saisir les paramètres indiqués dans le tableau ci-dessous :

#	Nom du paramètre	Valeur	Intervalle
1	Oven Temperature	60	int 18…65 °C
2	Poly_fill_Vol.	6500	6500…38000 steps
3	Current Stability	5,0	int 0…2000 uAmps
4	PreRun_Voltage	15,0	0…15 kvolts
5	Pre_Run_Time	180	1…1000 kvolts
6	Injection_Voltage	3,0	1…15 kvolts
7	Injection_Time	12,0	1…600 kvolts
8	Voltage_Number_of_Steps	20	1…100 kvolts
9	Voltage_Step_Interval	15	1…60 kvolts
10	Data_Delay_Time	60	1…3600 kvolts
11	Run_Voltage	15,0	0…15 kvolts
12	Run_Time	1200	300…14000 kvolts

Remarque : *Le « run time » (temps de traitement) varie en fonction de la température ambiante de l'emplacement où l'Analyseur génétique a été installé. Pour de plus amples informations sur la création de modules de série, veuillez consulter le manuel utilisateur des Analyseurs génétiques Applied Biosystems 3130.*

Créer le protocole MFI dans le Gestionnaire de protocole, s'assurer que les options suivantes sont sélectionnées :

- Type : Régulier
- Run Module (Module de série) : MFI (voir le module de série ci-dessous)
- Ensemble de fluorochromes : G5

Pour traiter les échantillons, créer une fiche d'échantillon en utilisant le Plate Manager (Gestionnaire de plaque) et s'assurer que le protocole adapté a été sélectionné pour le protocole d'instrument (voir ci-dessous).

Remarque : *Pour de plus amples informations sur la configuration de l'instrument, l'utilisation et le dépannage, veuillez consulter le manuel utilisateur des Analyseurs génétiques Applied Biosystems 3130.*

ABI3500 GENETIC ANALYZER (ANALYSEUR GÉNÉTIQUE)

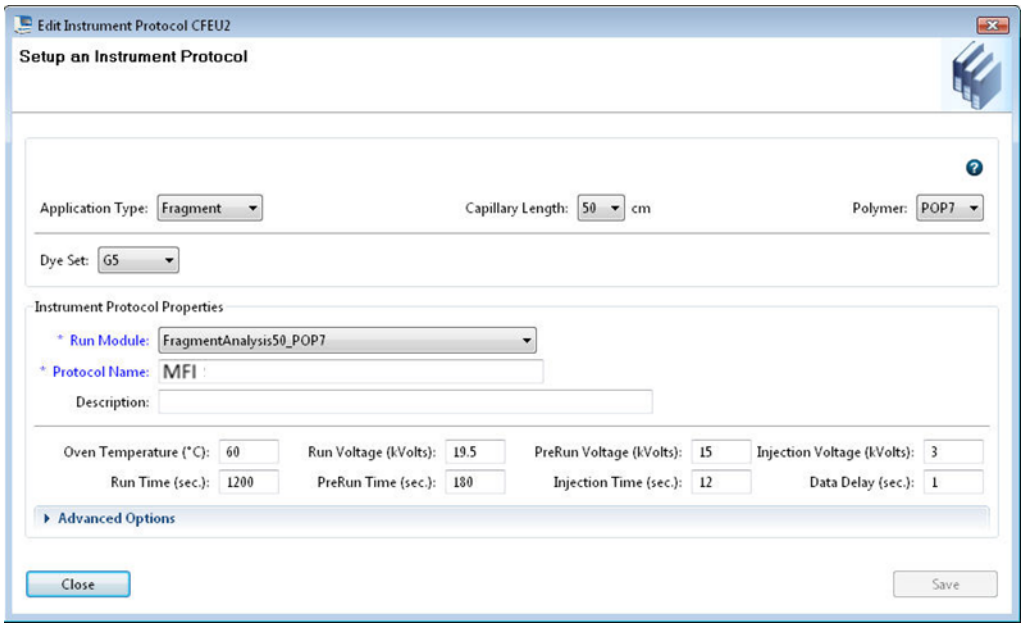
Un protocole d'instrument MFI doit être créé et pourra ensuite être réutilisé pour chaque série MFI.

Créer le protocole d'instrument MFI à l'aide de la bibliothèque de protocoles d'instrument du 3500.

S'assurer que les options suivantes sont sélectionnées :

• Run Module (Module de série) : FragmentAnalysis50_POP7

• Saisir les paramètres indiqués dans l'image ci-dessous :

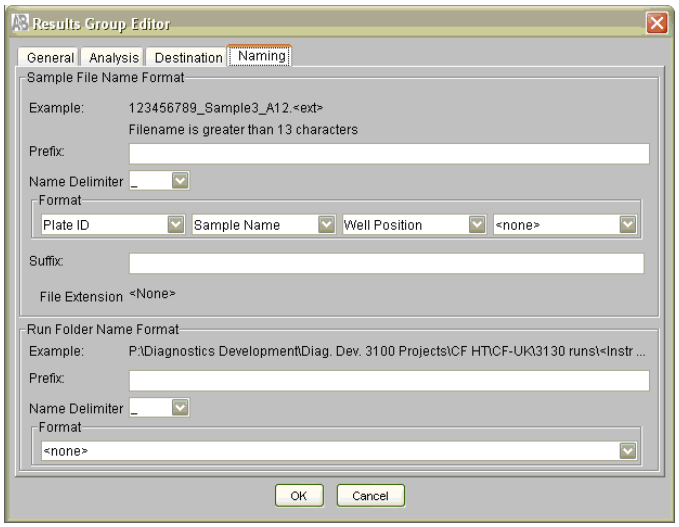


Pour traiter les échantillons, créer une plaque d'échantillons en cliquant sur « Create Plate from Template » (Créer plaque à partir de la matrice) sur le « Dashboard » (Tableau de bord), s'assurer que le protocole d'instrument adéquat pour MFI a été affecté (voir ci-dessus).

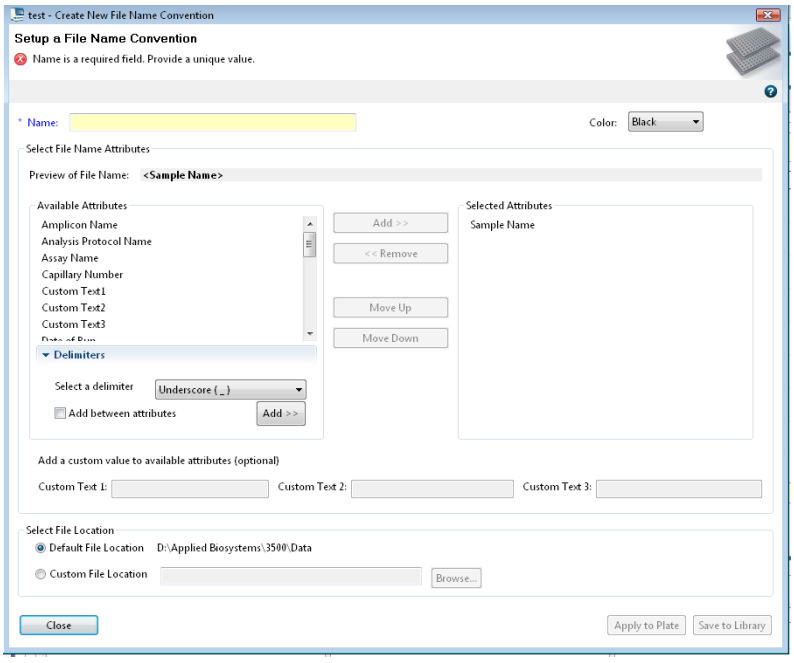
Configuration de fiche d'échantillon pour GeneMarker :

Le logiciel GeneMarker permet la comparaison directe entre les données A et B du même individu. Pour faciliter ce processus, il est important que le nom du fichier de sortie de données brutes (fsa) soit concordant pour tous les échantillons et mélanges. La fiche d'échantillon doit contenir le nom d'échantillon unique pour chaque échantillon testé suivi du suffixe_A ou _B selon le mélange testé. Si l'ID plaque doit être inclus dans le nom fsa, il faut choisir chaque fois un format fixe, p. ex. MFI JJMMAAAA.

Sur le **3130,** les paramètres de « Destination des résultats » doivent être définis de manière à inclure le nom de l'échantillon dans le nom du fichier fsa, p. ex. MFI JJMMAAAA_**1234,5**_**A**_A01.



Sur le **3500,** la convention de nom de fichier doit être définie de manière à inclure le nom de l'échantillon dans le nom du fichier fsa, p. ex. MFI JJMMAAAA_**1234,5**_**A**_A01.



Analyse et interprétation des résultats

Interprétation générale des résultats

Les produits PCR sont observés comme un système marqué par 5 fluorochromes utilisant un ensemble de filtres G5. L'ensemble de filtres G5 détecte les fragments marqués au 6-FAM (bleu), au VIC (vert), au NED (jaune) et au PET (rouge) plus le marqueur de taille marqué au LIZ (orange) sur un électrophorégramme et dans le programme GeneMapper ou GeneMarker.

http://www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

Remarque importante : *Différentes combinaisons d'appareils, de polymères et de marqueurs de taille peuvent produire une légère variation dans la dénomination des tailles. Au cours de la validation du kit, les utilisateurs doivent vérifier que les paramètres de segment par défaut produisent un étiquetage précis des pics et les ajuster si nécessaire. En cas de difficultés, veuillez contacter le support technique (techsupport@elucigene.com) pour obtenir des conseils.*

Analyse générale des orientations applicables à l'ensemble des produits Male Factor Infertility

1. Le contrôle négatif ne doit montrer aucun pic prononcé dans la plage de lecture comprise entre 100 et 550 pb.
2. Le contrôle positif doit montrer les résultats attendus et tous les pics doivent répondre aux critères ci-dessous.
3. Pour l'analyse de l'aneuploïdie des échantillons d'ADN, au moins un pic doit être observé pour chaque marqueur testé. La plage acceptable pour les pics de marqueur analysés sur l'analyseur génétique 3130 pour l'aneuploïdie et l'analyse de la microdélétion va de 50 à 6 000 unités relatives de fluorescence (urf) et de 175 à 32 000 urf pour les analyseurs génétiques 3500. Les hauteurs de pics situées en dehors de cette plage ne doivent pas être analysées.
4. Les électrophorégrammes de mauvaise qualité en raison d'une diffusion excessive entre les fluorochromes (aussi appelée « pull-up ») ou les « pointes d'électrophorèse » (pics prononcés présents dans plusieurs fluorochromes) ne doivent pas être interprétés. Les produits PCR doivent être ré-injectés et ré-analysés.
5. L'analyse de l'aneuploïdie est réalisée par l'évaluation des rapports de pics (A1/A2), où A1 correspond à la surface de pic du fragment plus court et A2 correspond à la surface de pic du fragment plus long. Le rapport résultant est un diagnostic du nombre de copies de locus. Pour les chromosomes disomiques, les marqueurs hétérozygotes doivent montrer deux pics de hauteur similaire. Une analyse complète de l'état du nombre de copies chromosomiques est réalisée par comparaison des rapports de surface de pic.
6. Les marqueurs diallélіques (c.-à-d. deux allèles) hétérozygotes doivent être compris dans une plage de rapport de 0,8 à 1,4. Cependant, pour deux allèles séparés par plus de 24 pb en taille, un rapport maximal de 1,5 est acceptable. Toutes les valeurs comprises dans cette région sont désignées comme ayant un rapport de 1:1. Si l'équilibre de rapport se situe en dehors de cette fenêtre, cela peut être dû à plusieurs facteurs, notamment :
    - Trisomie chromosomique totale (chromosome sexuel)
    - Trisomie chromosomique partielle (y compris les réplications submicroscopiques)
    - Mosaïcisme
    - Second génotype contaminant
    - Parasites (stutters) produisant un biais
    - Amplification préférentielle d'un allèle produisant un biais
    - Polymorphismes des sites d'amorce
    - Mutations somatiques des microsatellites

Le **Guide d'interprétation des produits Elucigene Male Factor Infertility**disponible sur le site web d'Elucigene fournit quelques exemples de profils typiques pour plusieurs d'entre eux. Les marqueurs homozygotes sont non informatifs car un rapport ne peut pas être déterminé.

Analyse des marqueurs de chromosomes sexuels AMEL,TAF9, XHPRT, DXYS218 et SRY (Essai Male Factor Infertility) :

Pour interpréter un résultat comme anormal pour ces marqueurs (c.-à-d. présence de trisomie), il est nécessaire d'avoir au moins deux marqueurs informatifs correspondant à un génotype triallélique, tous les autres marqueurs étant non informatifs. Il n'est pas recommandé d'interpréter un résultat comme anormal sur la base d'informations provenant d'un seul marqueur.

1. Le marqueur AMEL amplifie les séquences non polymorphiques sur les chromosomes X (104 pb) et Y (110 pb) et peut être utilisé pour déterminer la présence ou l'absence d'un chromosome Y, et représente la quantité relative de séquence X à Y. Veuillez noter qu'en de rares occasions un échec de l'amplification dû à une mutation de la séquence AMEL-Y a été signalé.
2. TAF9L est un marqueur paralogue invariant avec des séquences sur les chromosomes 3 et X. Le pic spécifique du chromosome 3 (116 pb, représentant 2 copies du chromosome 3) peut donc être utilisé comme pic de référence pour faciliter la détermination du nombre de chromosomes X présents (pic de 121 pb). Analysé en combinaison avec l'amélogénine et les autres marqueurs des chromosomes sexuels, il est particulièrement utile dans le diagnostic d'aneuploïdie des chromosomes sexuels. Chez une femme normale, les marqueurs doivent être compris dans une fenêtre de rapport de 0,8 à 1,4. Chez un homme normal, les marqueurs produiront un rapport de 1,8 ou plus. Le guide d'interprétation des produits **Elucigene Male Factor Infertility**donne plus de détails sur l'interprétation du marqueur TAF9L.
3. Le marqueur STR polymorphique DXYS218 est présent à la fois sur les chromosomes X et Y et représente le nombre total des chromosomes sexuels. Pour des résultats informatifs sur le patient masculin, il n'est pas possible de déterminer quel allèle représente le chromosome X ou Y.
4. Le marqueur informatif spécifique de X XHPRT représente le nombre de chromosomes X.
5. Le marqueur SRY spécifique de Y produit un seul pic chez les hommes normaux et n'amplifie pas chez les femmes normales.

Analyse des marqueurs de microdélétion du chromosome Y (Male Factor Infertility et MFI-Y*plus*) :

1. Tous les marqueurs de microdélétion du chromosome Y sont représentés par un pic unique. La perte d'un pic correspond à la microdélétion de cette région.
2. Le marqueur ZFX/ZFY représente des séquences à la fois sur les chromosomes X et Y. L'amplicon généré à partir des deux séquences n'étant pas distinguable par la taille, ce marqueur donnera un pic unique, indépendamment du sexe de l'échantillon. Ce marqueur n'est pas destiné à une utilisation diagnostique, il sert de contrôle d'amplification.

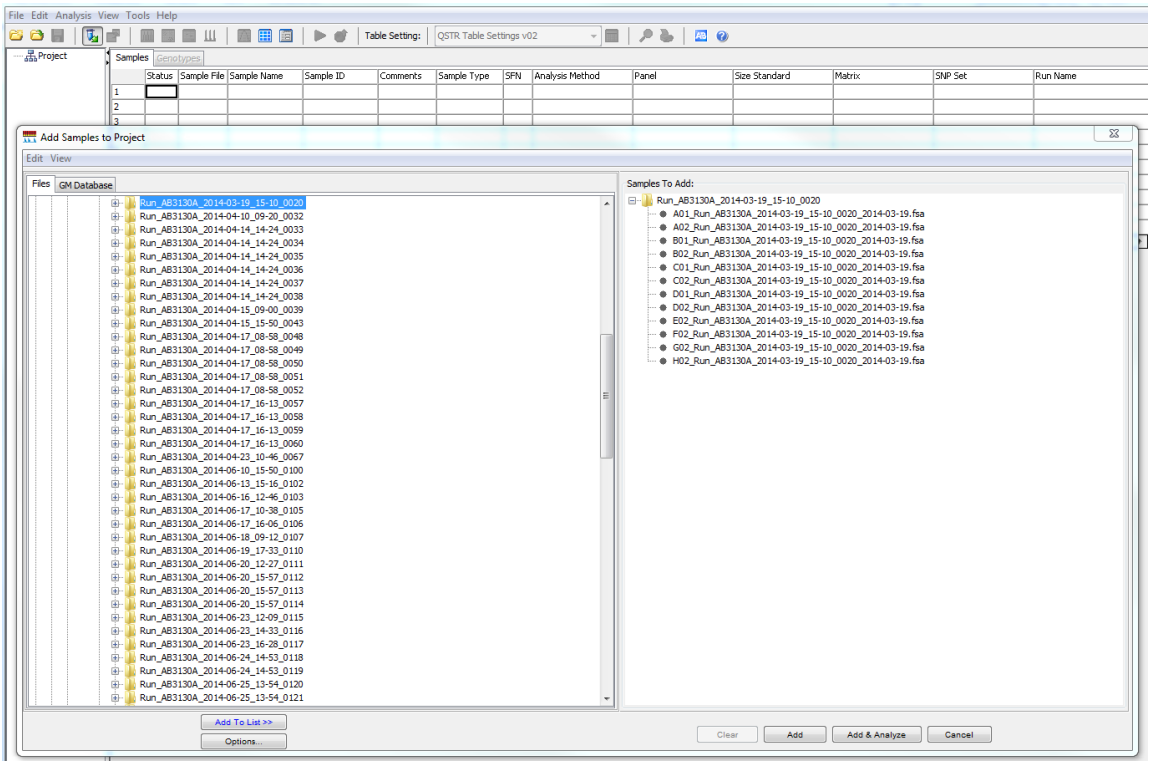
Guide d'analyse GeneMapper

Importer et analyser les fichiers du produit Male Factor Infertility

1. Ouvrir le fichier de l'application GeneMapper
2. Cliquer sur afin d'ajouter les fichiers de données à un nouveau projet. Naviguer à l'endroit de stockage des fichiers de données brutes .fsa, sélectionner les fichiers de données appropriés et cliquer sur le bouton « **Add to List** >> » (Ajouter à la liste >>).
3. Le dossier de traitement apparaît à présent dans la zone « **Samples to Add** » (Échantillons à ajouter). Double-cliquer sur l'icône du dossier de traitement dans cette fenêtre pour afficher chaque fichier .fsa à importer. Ajouter ensuite les échantillons en cliquant sur

en bas de l'écran. Les fichiers de données apparaissent à présent dans l'écran principal de GeneMapper (figure 2)

Figure 2 : Échantillons prêts à être ajoutés au projet



Importer les paramètres Male Factor Infertility pour GeneMapper dans GeneMapper Manager

Les paramètres Male Factor Infertility pour GeneMapper doivent être importés. Ce processus est contrôlé par l'interface « **GeneMapper Manager** ». Les paramètres du produit Male Factor Infertility pour GeneMapper sont disponibles sur le site Internet d'Elucigene :

http://www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

1. Ouvrir « **GeneMapper Manager** » en cliquant sur l'icône .
2. Sélectionner l'onglet « Analysis Methods » (Méthodes d'analyse) puis cliquer sur le bouton Import (Importer)
3. Parcourir les dossiers et importer le(s) fichier(s) de Paramètres d'analyses Male Factor Infertility requis (Male Factor Infertility ou MFI-Yplus (3130 ou 3500))
4. Recommencer le processus, en sélectionnant l'onglet approprié et en important le fichier correspondant pour :
    - Table Settings (Paramètres de tableau)
    - Plot Settings (Paramètres de graphe)
    - Size Standards (Marqueurs de taille)

Remarque : *Les paramètres Cluster Plot Settings (Paramètres de regroupement de graphe), Matrices (Matrices), SNP Sets (Ensembles SNP) et Report Settings (Paramètres de compte-rendu) ne nécessitent pas d'importation de fichier.*

Remarque* : *Si les essais Male Factor Infertility ou MFI-Yplus sont réalisés en combinaison avec l'essai Elucigene CFEU2 (fibrose cystique), le paramètre de marqueur de taille CFEU2 peut être utilisé en lieu et place.*

Importer les paramètres Male Factor Infertility dans Panel Manager

Les paramètres de panel et de segment Male Factor Infertility et MFI Y-plus pour GeneMapper doivent être importés. Ce processus est contrôlé par l'interface « Panel Manager » (Gestionnaire de panel).

Les paramètres de panel et de segment GeneMapper spécifiques au produit Male Factor Infertility sont disponibles sur le site Internet de Elucigene :

http://www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

1. Ouvrir l'application Panel Manager (Gestionnaire de panel) en cliquant sur l'icône .

2. Cliquer sur « **Panel Manager** » (Gestionnaire de panel) dans la fenêtre de navigation de gauche. Le Gestionnaire de panel apparaît à présent surligné en bleu.

3. Sélectionner « **File/Import Panels** » (Fichier/Importer panels). Parcourir les dossiers et importer le fichier de panel GeneMapper « **Male Factor Infertility_Panels.txt** » (Figure 4). Pour MFI-Yplus, veuillez sélectionner **MFI Y-plus_Panels.txt**.

4. Le fichier de panel apparaît à présent dans la fenêtre de navigation de gauche. Cliquer sur le fichier de panel pour qu'il soit surligné en bleu.

5. Sélectionner « **File/Import Bin Set** » (Fichier/Importer ensemble de segments). Parcourir les dossiers et importer le fichier de segment GeneMapper **« Male Factor Infertility_Male Factor Infertility_ bins.txt »** (Figure 5). Pour MFI-Y*plus,* veuillez sélectionner MFI Y-plus_ MFI Y-plus_bins.txt.

6. Cliquer sur « **Apply** » (Appliquer) puis sur « **OK** ».

Figure 4 : Importer le fichier de panel de l'essai Male Factor Infertility

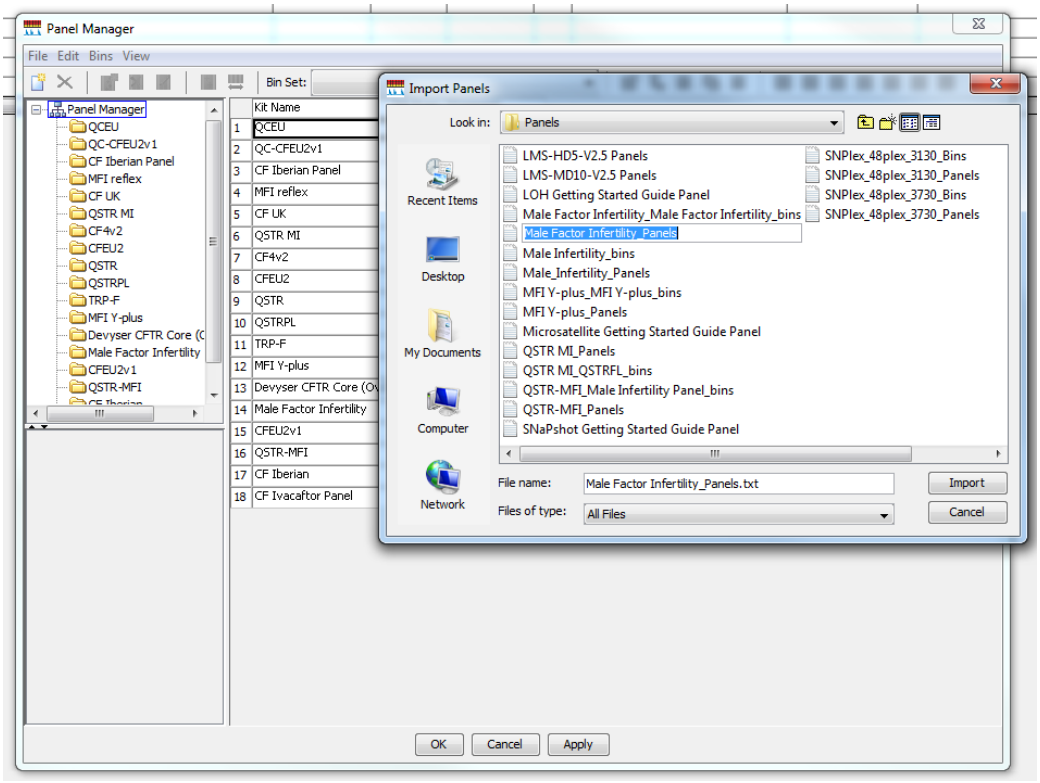
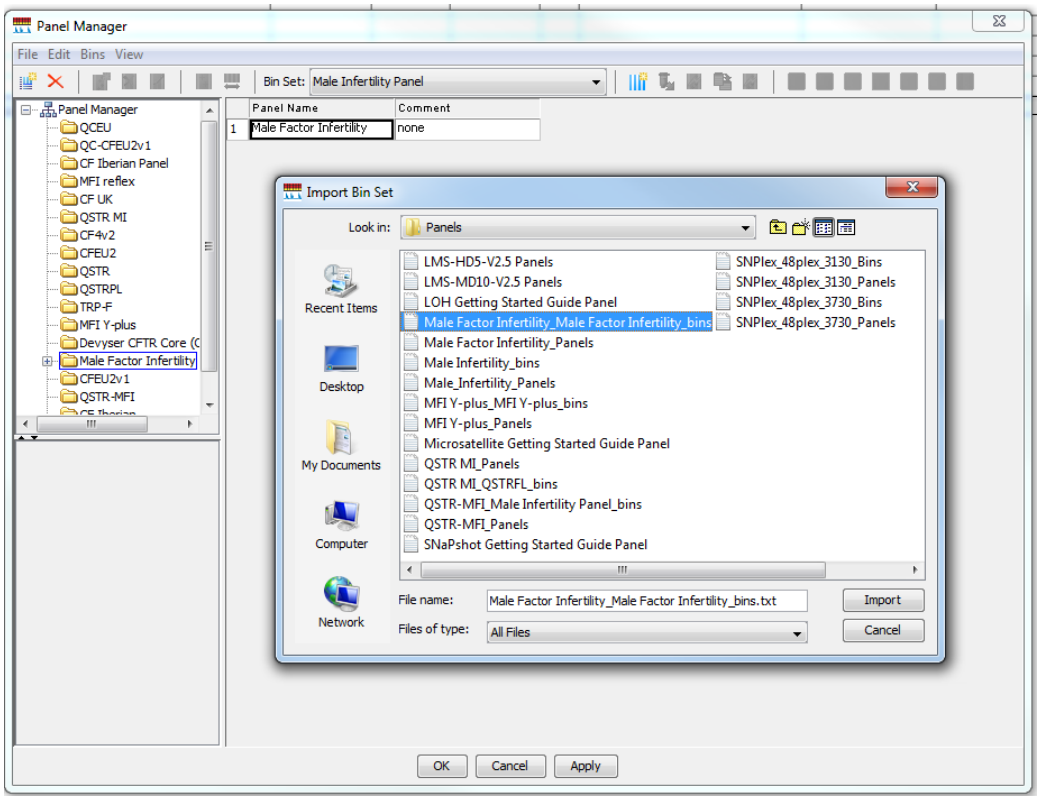


Figure 5 : Importer le fichier de segment de l'essai Male Factor Infertility



Modifier le fichier de paramètres d'analyse

It Il peut être nécessaire de modifier les « **Analysis Ranges** » (Plages d'analyse) par défaut dans les paramètres d'analyse QST*R pour représenter la variance locale des conditions d'analyse. La plage minimum d'analyse dépendra du capillaire et du polymère utilisés pendant la collecte des données. Procédure pour visualiser les paramètres d'analyse actuels :

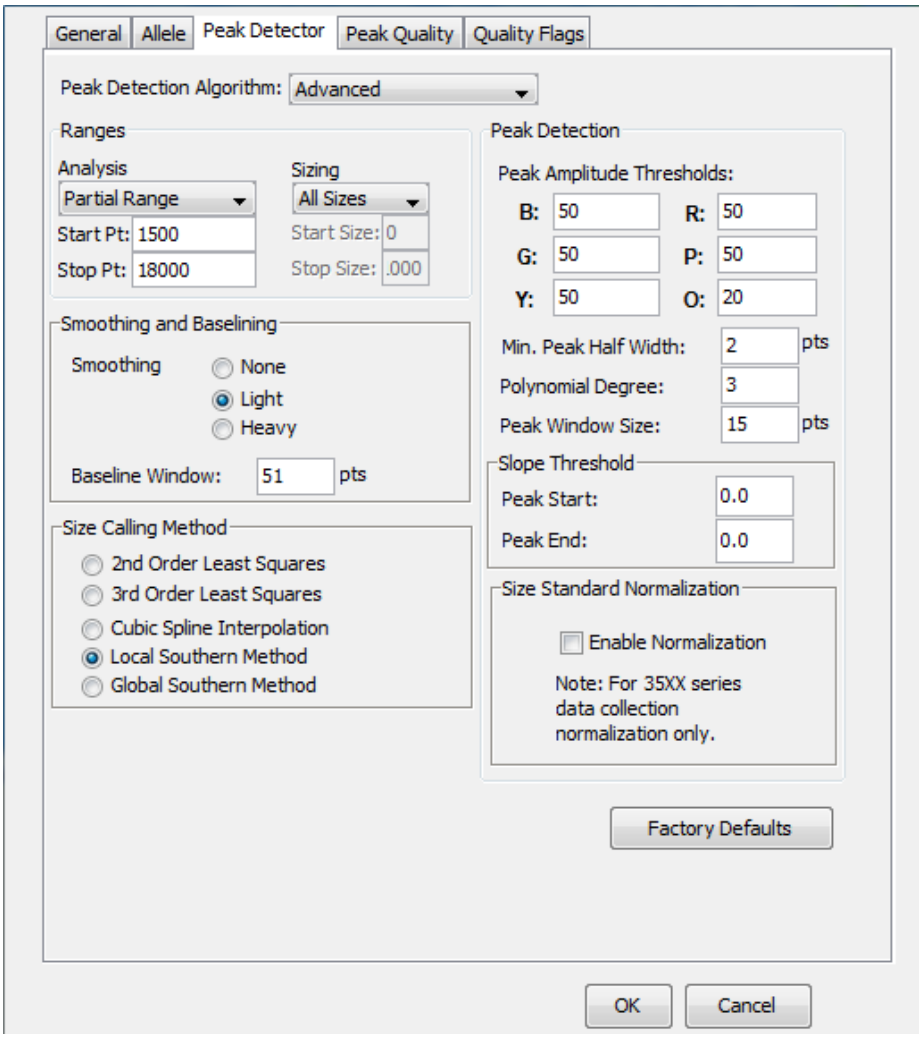
1. Ouvrir « **GeneMapper Manager** » en cliquant sur l' icône.

2. Sélectionner l'onglet « **Analysis Methods** » (Méthodes d'analyse). Le fichier du produit Male Factor Infertility sera répertorié comme « **Male Factor Infertility Analysis Settings** » pour Male Factor Infertility ou **« Male Factor Infertility Y-plus »** pour MFI-Y*plus*.

3. Cliquer sur « **Male Infertility Panel »** pour Male Factor Infertility ou **« Male Factor Infertility Y-plus »** for MFI-Y*plus*. La ligne apparaît à présent surlignée.

4. Cliquer sur le bouton « **Open** » (Ouvrir) et sélectionner l'onglet « **Peak Detector** » (Détecteur de pic) (figure 6)

Figure 6 : Plages d'analyse.



Procédure pour déterminer la plage d'analyse adaptée à votre laboratoire :

1. Dans la fenêtre principale GeneMapper, double-cliquer sur le dossier de traitement importé, pour visualiser la liste des fichiers .fsa qu'il contient.

2. Sélectionner un fichier .fsa.

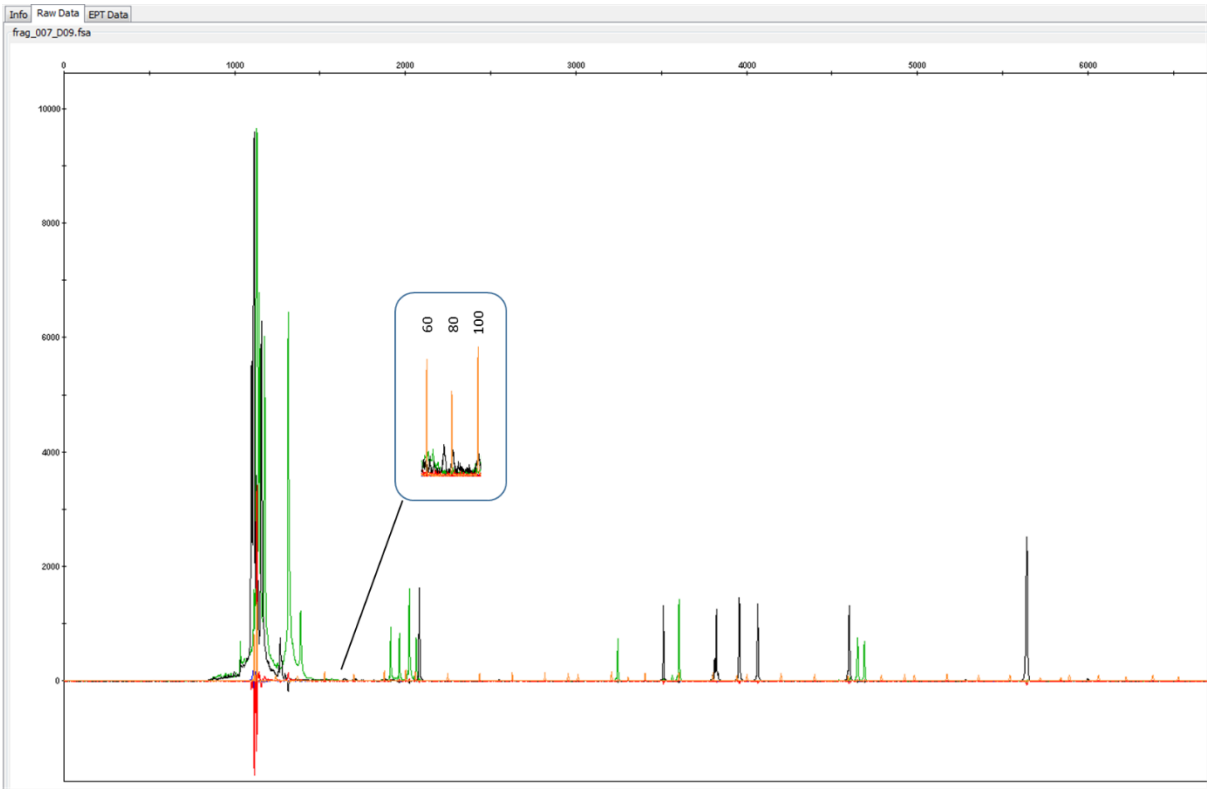
3. Cliquer sur l'onglet « Raw data » (Données brutes) pour afficher l'électrophérogramme des données brutes.

4. En utilisant le premier pic du marqueur de taille (par ex., GS600LIZv2 de 60 pb) comme référence, sélectionner un point de données supérieur d'environ 100 points de données (figure 7). Cela permet de déterminer le point le plus bas dans la plage analysable.

5. S'assurer que la plage maximale d'analyse inclut le plus grand pic du marqueur de taille (GS600LIZv2 de 600 pb).

6. Saisir les nouvelles valeurs dans le fichier d'analyse (en y accédant comme décrit ci-dessus).

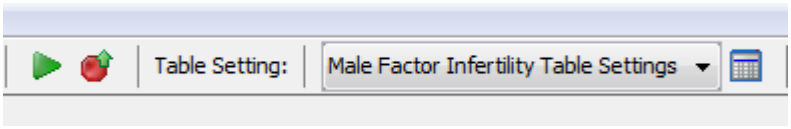
Figure 7 : Détermination de la plage minimale à l'aide des données brutes d'échantillon



Analyse des fichiers de panel Male Factor Infertility importés

1. Dans la fenêtre principale GeneMapper, sélectionner « Male Factor Infertility Table Setting » (Paramètres de tableau Male Factor Infertility) (figure 8)

Figure 8 Définir les paramètres de tableau



2. Sous l'onglet « **Analysis Method** », sélectionnez « **Male Factor Infertility Analysis Settings** » ou « **Male Factor Infertility Y-plus »** pour Male Factor Infertiity ou MFI-Y*plus* respectivement. Remplir chaque colonne en cliquant sur les touches « **Ctrl+D** ». Répéter ce processus en sélectionnant « **Male Factor Infertility »** ou « **MFI Y-plus** » sous la rubrique « **Panel »** et « **Male Factor Infertility Size Standard** » sous la rubrique « **Size Standard »**. Penser à remplir en cliquant sur les touches « **Ctrl+D** » pour s'assurer que chaque paramètre est appliqué à l'ensemble de la liste des échantillons.

3. Cliquer sur pour démarrer l'analyse de l'échantillon. À l'invite, affecter le nom de projet.

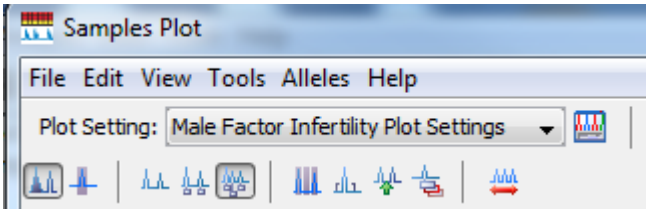
Examen des données du produit Male Factor Infertility

1. Sélectionner l'échantillon pour analyse (surligner la ligne de l'échantillon).

2. Cliquer sur « **Display Plots » (afficher les graphes).**

3. Sélectionner « **Male Factor Infertility Plot Settings »** (figure 9) ou **« MFI-plus »** suivant l'essai analysé.

Figure 9 : Menu déroulant des paramètres de graphe Male Factor Infertility.



4. La fenêtre de graphe affiche le profil d'échantillon avec les données tabulées (figure 10). Deux pics au maximum pour chaque marqueur sont automatiquement étiquetés par GeneMapper. En présence de trois allèles pour un marqueur, le troisième pic non étiqueté doit être étiqueté manuellement (voir : Modifier manuellement les profils, ci-dessous).

Remarque : *Les plages de taille des allèles pour chaque marqueur sont basées sur les données observées antérieurement. De rares*
allèles peuvent être en dehors de la plage de taille de marqueur donnée, et il peut être nécessaire d'ajuster
en conséquence l'ensemble de segments.

5. Il est recommandé d'activer le paramètre « **Single click editing** » (Modification par clic unique) sur la fenêtre de graphe. Pour cela, sélectionner « **Alleles/set click editing** » (Allèles/Paramétrage de modification par clic) et s'assurer que cette option est cochée.

Figure 10 : Fenêtre de graphe d'échantillon affichant les données de tracé étiquetées et tableau des génotypes correspondants

Modifier manuellement les profils

AVERTISSEMENT :

GeneMapper affecte des étiquettes uniquement pour un maximum de 2 pics par marqueur. Il est donc possible qu'une modification manuelle des profils soit requise, c.-à-d. lors de l'affectation d'étiquettes aux 3e pics (le cas échéant) ou de la suppression d'étiquettes de pics parasites (stutters).

Pour ajouter une étiquette de pic, cliquez avec le bouton de gauche sur le pic non étiqueté. L'utilisateur aura l'option d'ajouter un commentaire d'allèle. Cliquer sur « **OK** ». Le pic sera maintenant étiqueté avec sa taille en paires de bases et sa surface de pic. Le tableau incorpore automatiquement le pic qui vient d'être étiqueté.

Pour supprimer une étiquette de pic, cliquez avec le bouton de gauche sur l'étiquette du pic. L'utilisateur aura l'option de supprimer le commentaire d'allèle. Cliquer sur « **OK** ». L'étiquette du pic est ensuite supprimée. Le tableau retire automatiquement les données du pic supprimé.

Copier les données de tableau

1. Surligner toutes les lignes dans le tableau au bas de la fenêtre de graphe.

2. Copier les lignes sélectionnées en appuyant sur les touches « **Ctrl+C** ».

Guide d'analyse GeneMarker

Ajouter des fichiers d'échantillons à GeneMarker

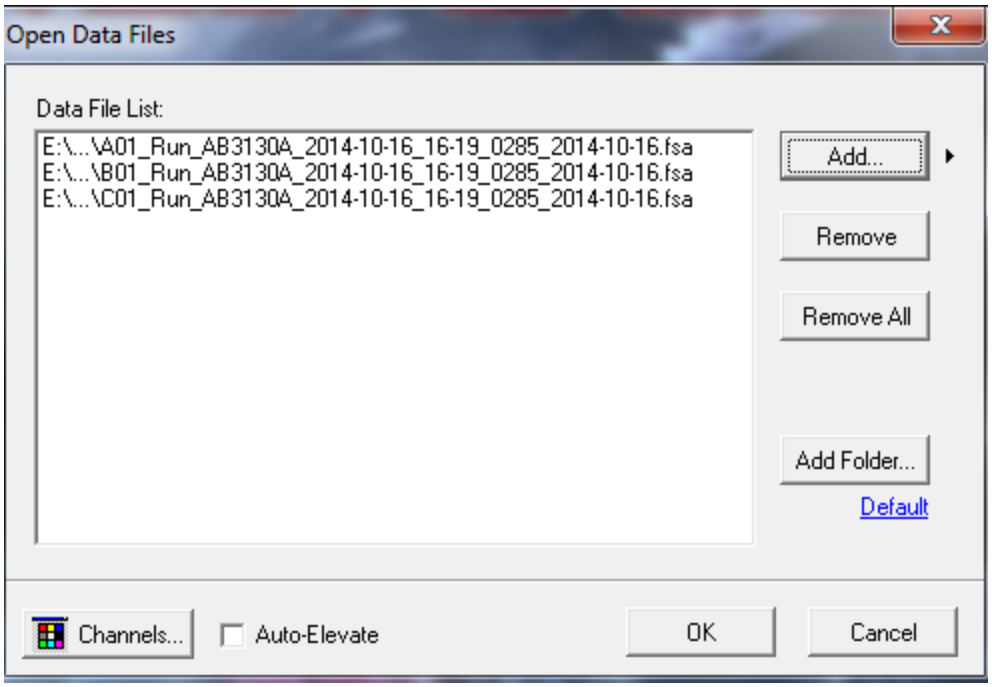
Ouvrir le fichier de l'application Genemarker et sélectionner « **Open Data** » (Ouvrir données) à l'invite. La boîte de dialogue Open Data Files (Ouvrir fichiers de données) apparaît.

Cliquer sur le bouton « **Add** » (ajouter). La boîte de dialogue Open (Ouvrir) apparaît. Parcourir les dossiers jusqu'au répertoire contenant les fichiers de données brutes ;

1. Sélectionner tous les fichiers par CTRL+A ou utiliser les touches CTRL et/ou MAJ pour sélectionner des échantillons individuels.

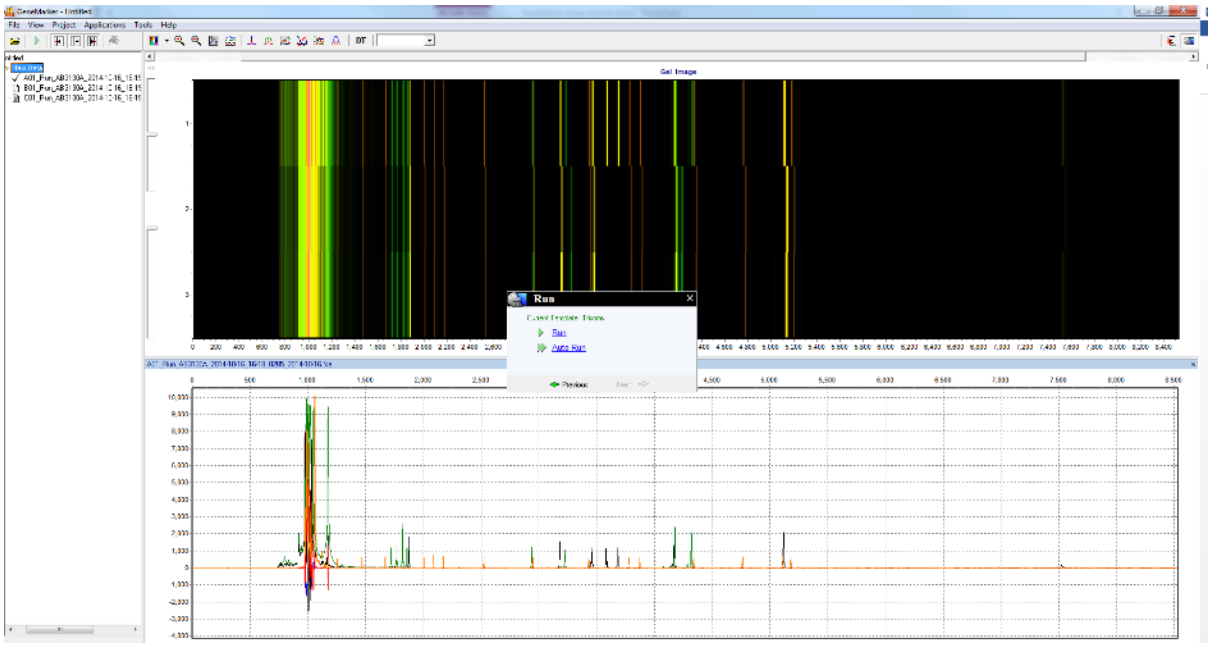
2. Cliquer sur le bouton « **Open** » dans la boîte de dialogue Open (ouvrir). Les fichiers sélectionnés apparaissent dans le champ Data File List (Liste de fichiers de données) (figure 11).

Figure 11 : Échantillons ajoutés à la liste de fichiers de données.



3. Cliquer sur le bouton **« OK »** dans la boîte de dialogue Open Data Files (Ouvrir les fichiers de données) pour charger les échantillons dans GeneMarker. Le logiciel ouvrira alors automatiquement la fenêtre Raw Data Analysis (Analyse des données brutes) (figure 12).

Figure 12 : Fenêtre d'analyse des données brutes



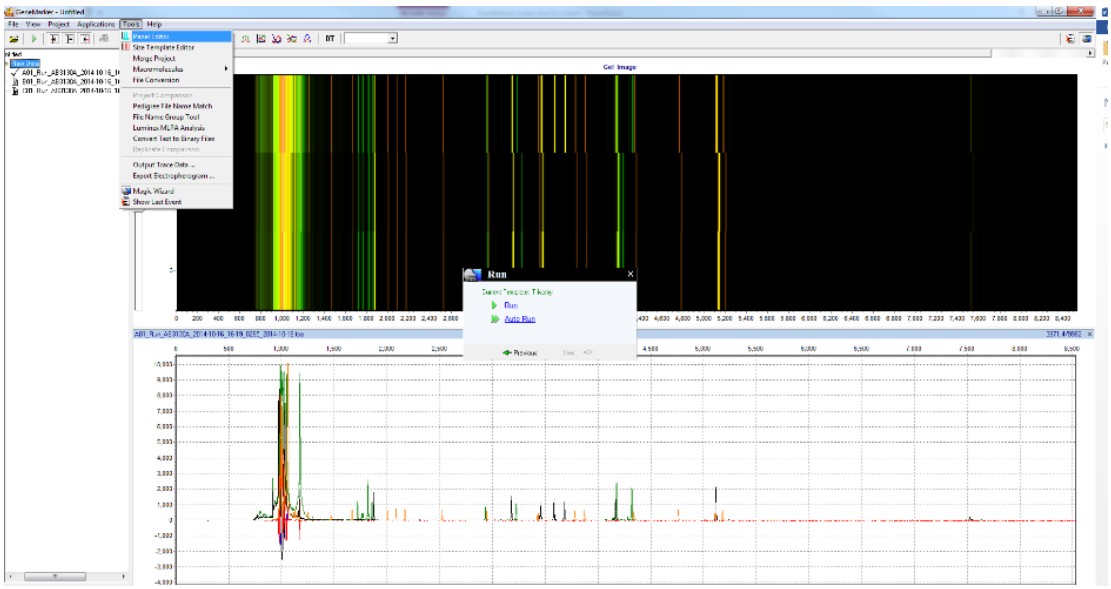
Importer les paramètres de panel Male Factor Infertility pour GeneMarker

Les paramètres de panel Male Factor Infertility pour GeneMarker doivent être importés. Ce processus est contrôlé par l'interface « **Panel Editor** » (Éditeur de panel).

Les paramètres de panel Male Factor Infertility sont disponibles sur le site Internet de Elucigene : www.elucigene.com/product-category/reproductive-health/

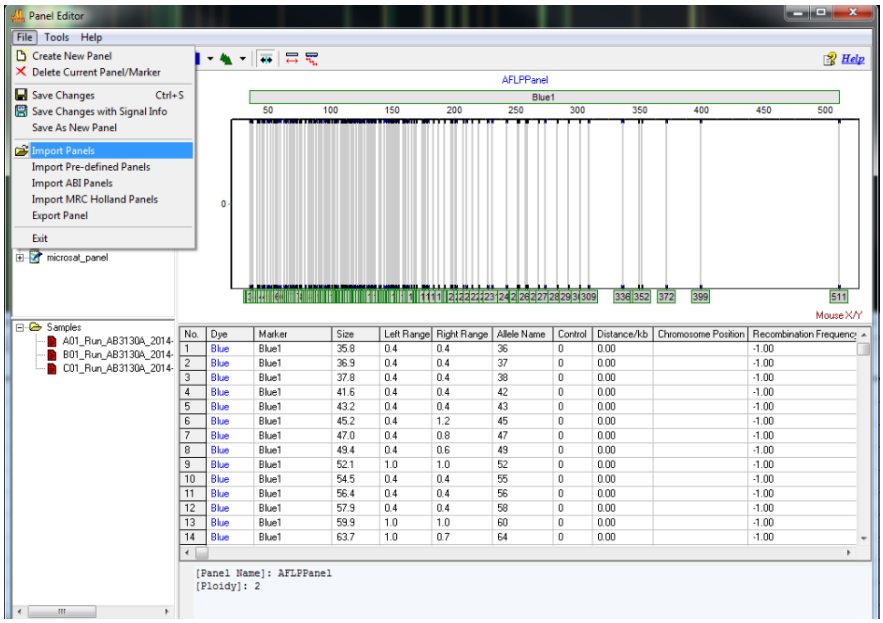
1. Ouvrir « **Panel Editor** » (Éditeur de panel) dans le menu déroulant « Tools » (Outils)(Figure 13).

Figure 13 : Sélection de l'éditeur de panel



2. Sélectionner « Import Panels » (Importer les panels) dans le menu déroulant « File » (Fichier) (figure 14)

Figure 14 : Importation des panels


Panel Editor
File Tools Help
Create New Panel
Delete Current Panel/Marker
Save Changes Ctrl+S
Save Changes with Signal Info
Save As New Panel
Import Panels
Import Pre-defined Panels
Import ABI Panels
Import MRC Holland Panels
Export Panel
Exit
microsat_panel
Samples
A01_Run_AB3130A_2014-
B01_Run_AB3130A_2014-
C01_Run_AB3130A_2014-
Help
AFLPPanel
Blue1
50 100 150 200 250 300 350 400 450 500
No. Dye Marker Size Left Range Right Range Allele Name Control Distance/kb Chromosome Position Recombination Frequenc
1 Blue Blue1 35.8 0.4 0.4 36 0 0.00 -1.00
2 Blue Blue1 36.9 0.4 0.4 37 0 0.00 -1.00
3 Blue Blue1 37.8 0.4 0.4 38 0 0.00 -1.00
4 Blue Blue1 41.6 0.4 0.4 42 0 0.00 -1.00
5 Blue Blue1 43.2 0.4 0.4 43 0 0.00 -1.00
6 Blue Blue1 45.2 0.4 1.2 45 0 0.00 -1.00
7 Blue Blue1 47.0 0.4 0.8 47 0 0.00 -1.00
8 Blue Blue1 49.4 0.4 0.6 49 0 0.00 -1.00
9 Blue Blue1 52.1 1.0 1.0 52 0 0.00 -1.00
10 Blue Blue1 54.5 0.4 0.4 55 0 0.00 -1.00
11 Blue Blue1 56.4 0.4 0.4 56 0 0.00 -1.00
12 Blue Blue1 57.9 0.4 0.4 58 0 0.00 -1.00
13 Blue Blue1 59.9 1.0 1.0 60 0 0.00 -1.00
14 Blue Blue1 63.7 1.0 0.7 64 0 0.00 -1.00
[Panel Name]: AFLPPanel
[Ploidy]: 2

3. Parcourir les dossiers et importer les fichiers de panel GeneMarker MFI.xml ou GeneMarker Y-plus.

4. Répéter ce processus selon les besoins pour d'autres fichiers de panel appropriés.

Traiter les données

Une fois les fichiers de données brutes chargés dans GeneMarker, ils sont prêts à être traités. L'étape de traitement comprend l'application d'un marqueur de taille, le filtrage des pics de bruit et la comparaison avec un panel d'allèles connu si cela est souhaité.

GeneMarker combine toutes les étapes en un outil simple appelé « **Run Wizard** » (Assistant de traitement) (Figure 15). Pour accéder au Run Wizard (Assistant de traitement), il suffit de cliquer sur l'icône « **Run Project** » (Traiter le projet) dans la barre d'outils principale.

Run Wizard (Assistant de traitement) – Création d'une matrice de traitement

Il est nécessaire de créer une matrice de traitement lors de l'utilisation initiale de ce logiciel pour l'analyse des données du produit Male Factor Infertility. Cela est réalisé à l'aide du Run Wizard (Assistant de traitement) ;

1. Pour accéder au Run Wizard (Assistant de traitement), il suffit de cliquer sur l'icône « **Run Project** » (Traiter le projet) dans la barre d'outils principale.

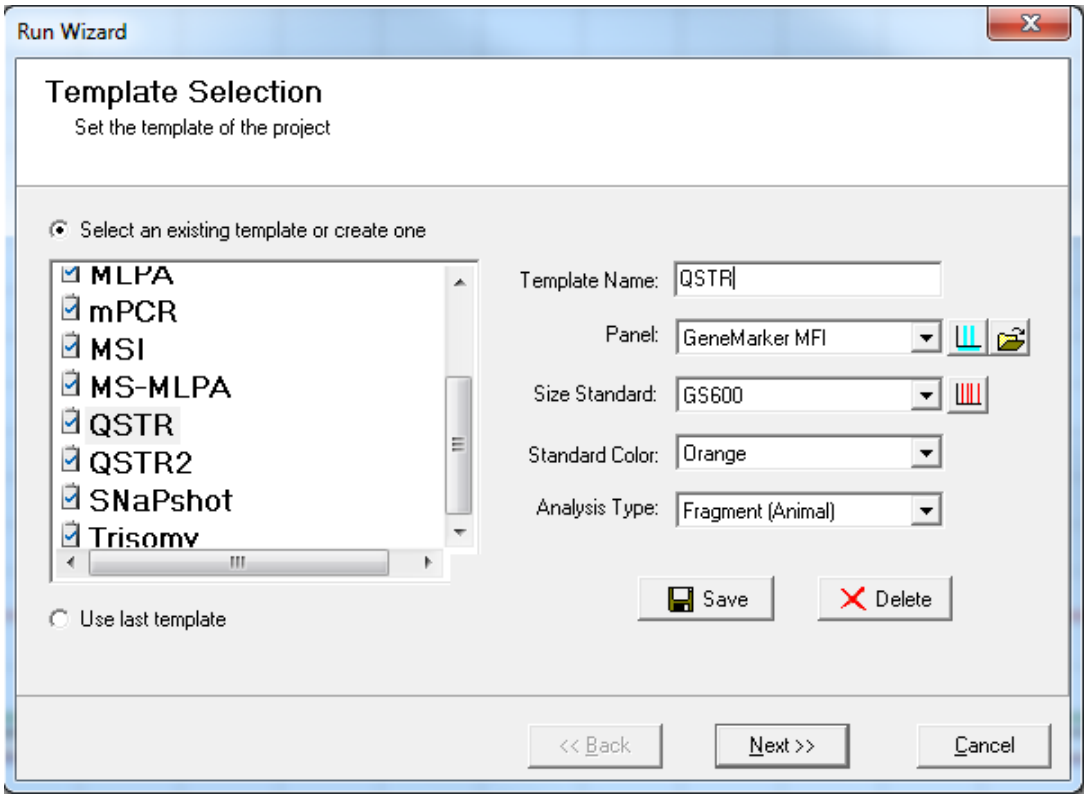
2. Renseigner le champ Template Name (nom de matrice), par ex. **QSTR.**

3. Sélectionner Panel, Size Standard (Marqueur de taille), Standard Colour (Couleur du marqueur de taille) et Analysis Type (Type d'analyse) comme cela est montré dans la figure 15 ci-dessous.

4. Cliquer sur « **Save** » (Enregistrer) pour sauvegarder la matrice à des fins d'analyses ultérieures.

5. Cliquer sur « **Next** » pour continuer.

Figure 15 : Run Wizard (Assistant de traitement) – Fenêtre Template Selection (sélection de la matrice)



Run Wizard (Assistant de traitement) – Data Process (Traitement des données)

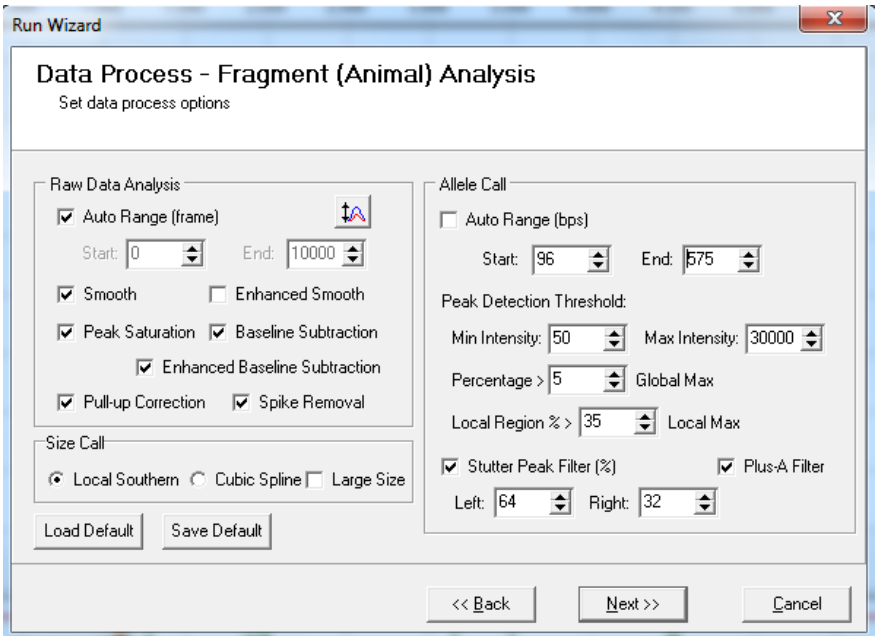
La fenêtre Data Process (Traitement des données) du Run Wizard (Assistant de traitement) permet à l'utilisateur de sélectionner les paramètres de filtrage des pics.

1. Sélectionner les paramètres d'analyse appropriés dans la fenêtre Data Process (Traitement des données), tel que cela est montré dans la figure ci-dessous (figure 16).

2. Cliquer sur « **Next** » pour continuer

Remarque : *La plage des paramètres d'analyse dans la boîte de dialogue Raw Data Analysis (Analyse des données brutes) varie en fonction du polymère utilisé au cours du recueil des données. L'utilisateur doit sélectionner une valeur de point de départ qui comprend le pic de marqueur de taille 60 pb.*

Figure 16 : Run Wizard (Assistant de traitement) – Data Process Window (Fenêtre de traitement des données)



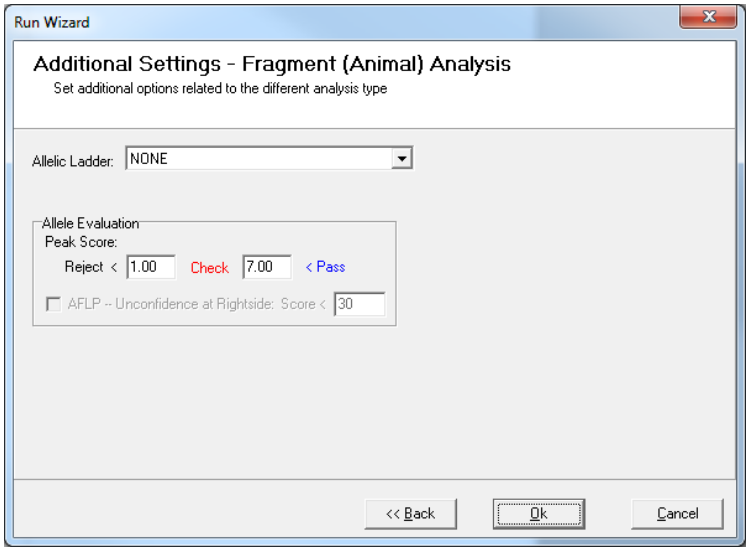
Remarque : *Pour les données du 3500, augmenter le paramètre Minimum Intensity (Intensité minimale) à 150*

Run Wizard (Assistant de traitement) – Paramètres supplémentaires

Aucun paramètre supplémentaire n'est requis (figure 17).

1. Cliquer sur « **OK** » pour continuer.

Figure 17 : Run Wizard (Assistant de traitement) – Paramètres supplémentaires

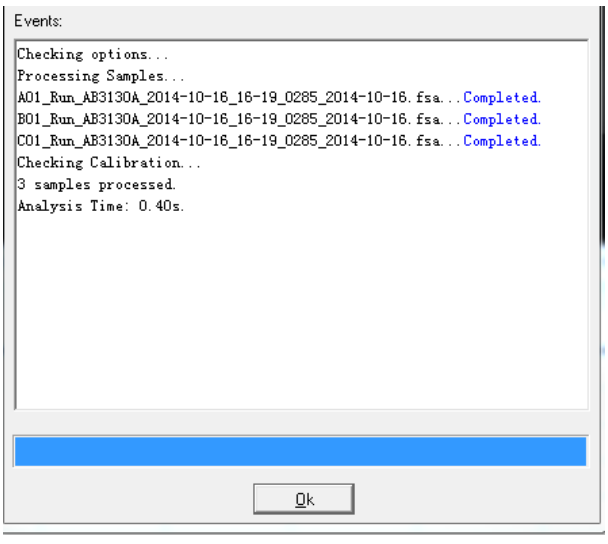


Boîte de dialogue de traitement des données

Après avoir cliqué sur « **OK** » dans la boîte de dialogue Additional Settings (Paramètres supplémentaires) du Run Wizard (Assistant de traitement), la boîte de dialogue Data Processing (Traitement des données) apparaît (Figure 18). Les données brutes sont traitées et mesurées, puis les paramètres de filtrage et le panel sélectionné sont appliqués.

1. Cliquer sur « **OK** » dans la boîte de dialogue (Traitement des données) quand l'analyse est terminée.

Figure 18 : Boîte de dialogue de traitement des données



Fenêtre principale d'analyse

La disposition de la fenêtre principale d'analyse (figure 19) de GeneMarker est simple à utiliser. Cette disposition comprend les éléments suivants :

- Liste des fichiers d'échantillon – affichée dans la partie gauche de la fenêtre.
- Image du gel synthétique – affichée en haut de la fenêtre.
- Électrophérogrammes des données – en dessous de l'image du gel.
- Tableau de compte-rendu – affiché dans la partie droite de la fenêtre.

Il est important de vérifier dans cette fenêtre que tous les pics appropriés de chaque profil ont été correctement dénommés.

1. Double-cliquer successivement sur chaque échantillon dans l'arborescence des fichiers d'échantillon du côté gauche de l'écran. Cliquer avec le bouton droit sur les pics en question et choisir dans les options de la boîte de dialogue, par ex. modifier ou supprimer l'allèle, confirmer ou annuler la confirmation, selon le cas.

2. Dans la fenêtre Main Analysis (Analyse principale), sélectionner l'option de menu déroulant « **Applications** » en haut de l'écran. Sélectionner « **Trisomy Analysis** » (Analyse de trisomie). La boîte de dialogue Trisomy Analysis Settings (Paramètres d'analyse de trisomie) s'ouvre alors (figure 20).

Figure 19 : Fenêtre principale d'analyse

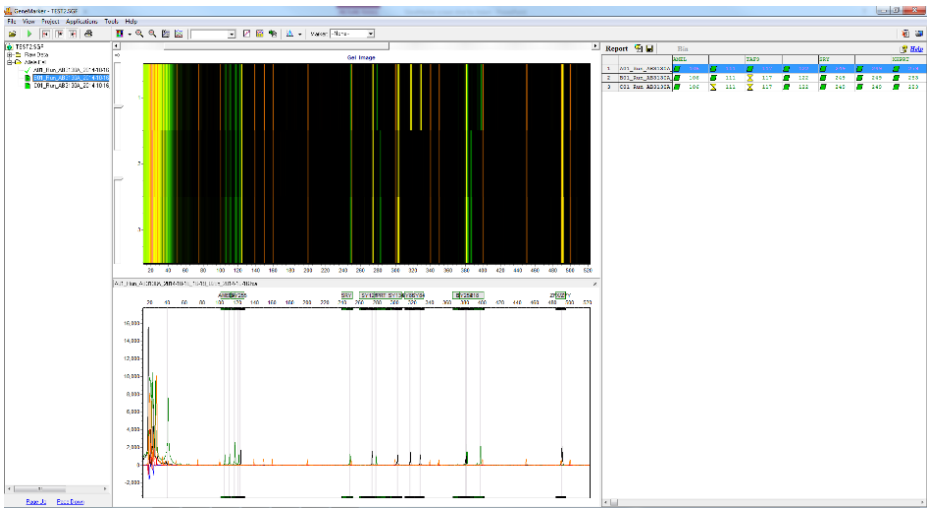
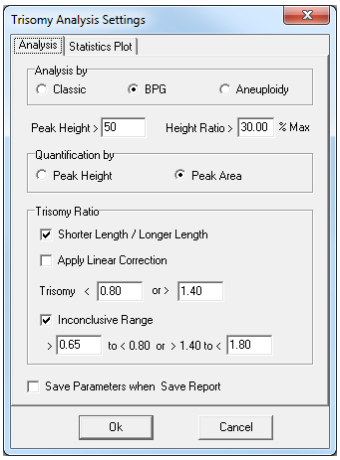


Figure 20 : Boîte de dialogue des Trisomy Analysis Settings (paramètres d'analyse de trisomie)



Remarque : *Pour les données du 3500, augmenter le paramètre Minimum Intensity (Intensité minimale) à 150*

Trisomy Analysis Settings (paramètres d'analyse de trisomie)

Deux onglets sont disponibles dans la boîte de dialogue Trisomy Analysis Settings (Paramètres d'analyse de trisomie) :

1. Onglet Analysis (Analyse).

2. Onglet Statistics Plot (Graphe des statistiques).

Onglet Analysis (Analyse)

L'onglet Analysis (Analyse) offre des options de paramétrage du seuil pour l'analyse de trisomie. Il convient de s'assurer que « **BPG** » est sélectionné dans la boîte d'analyse et que les paramètres suivants sont affichés :

- Peak Height (Hauteur de pic) 50 : Hauteur minimale de 50 pour la dénomination des pics. (150 pour les données du 3500)
- Height Ratio (Rapport de hauteur) 30 % : Pourcentage maximum du pic principal devant être atteint par le deuxième pic pour que deux allèles soient identifiés.
- Quantification by Peak Area (Quantification par surface de pic).
- Option Shorter Length/Longer Length (Longueur plus courte/longueur plus longue) cochée.
- Les seuils pour Trisomy Ratio (Rapport de trisomie) sont de 0,80 à 1,40.
- Option Apply Linear Correction (Appliquer la correction linéaire) décochée.
- Cliquer sur « **OK** »

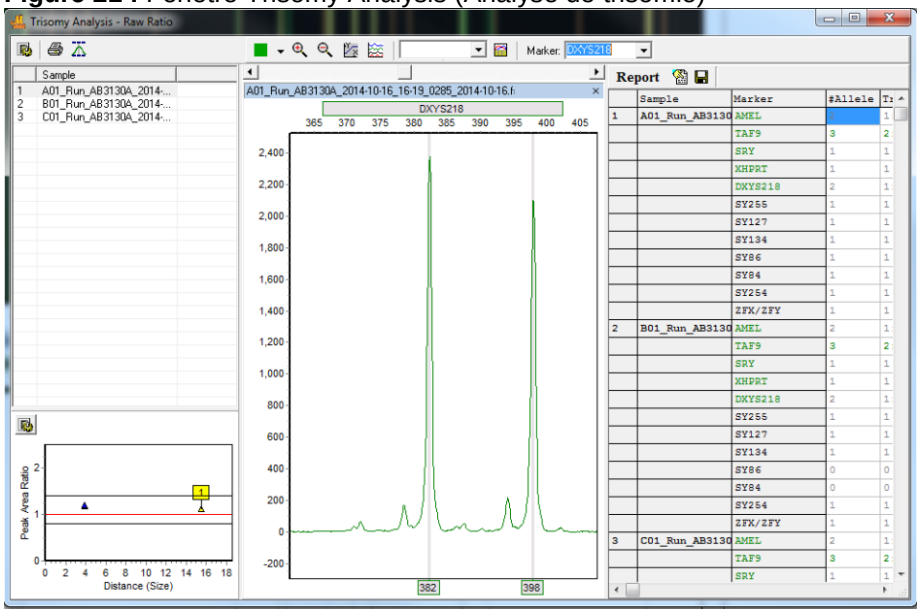
Fenêtre Trisomy Analysis (Analyse de trisomie)

La fenêtre Trisomy Analysis (Analyse de trisomie) (figure 21) permet à l'utilisateur d'examiner les données d'échantillon de l'aneuploïdie.
d'afficher le rapport des pics pour chaque marqueur et d'accéder au compte-rendu GeneMarker.
Plusieurs affichages aident l'utilisateur dans l'analyse des données ; ce sont les suivants :

- Liste des échantillons
- Électrophérogramme
- Graphe de rapport
- Tableau de compte-rendu

Veuillez noter que l'analyse de trisomie n'est pas nécessaire pour les données de microdélétion du chromosome Y.

Figure 21 : Fenêtre Trisomy Analysis (Analyse de trisomie)



Pour obtenir plus d'informations sur les fonctions d'analyse de trisomie et leur utilisation, consulter le manuel GeneMarker.

Compte-rendu GeneMarker

GeneMarker comprend un modèle de rapport compatible avec le kit Elucigene Male Factor Infertility (cette fonctionnalité n'est pas nécessaire pour l'analyse des données à partir de l'essai MFI-Yplus). Pour accéder au compte-rendu, cliquer sur l'icône « Print » (Imprimer) située dans la barre d'outils en haut à gauche de la fenêtre Trisomy Analysis (Analyse de trisomie).

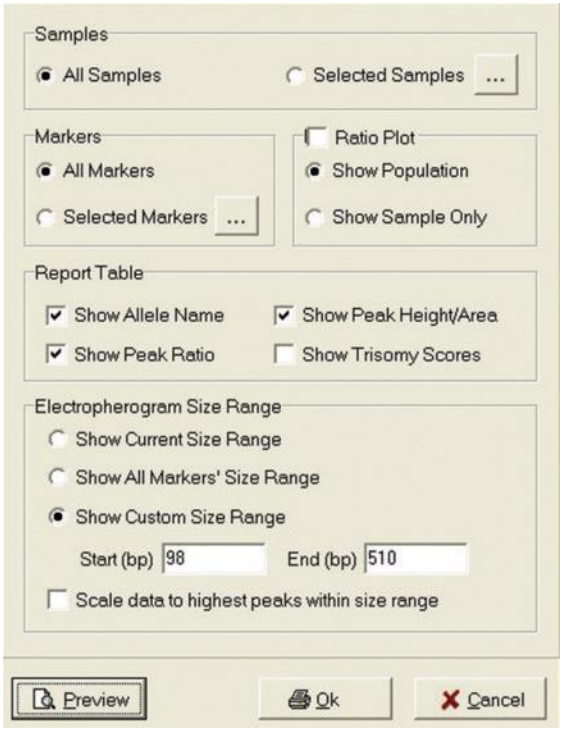
La fenêtre Trisomy Print Settings (Paramètres d'impression de trisomie) s'ouvre (figure 22).

Trisomy Print Settings Window (Fenêtre des paramètres d'impression de trisomie)

La fenêtre Trisomy Print Settings (paramètres d'impression de trisomie) montre le détail des options d'inclusion et d'affichage des données d'échantillon dans le compte-rendu GeneMarker.

Sélectionner les options tel que décrit dans la figure 22. S'assurer que « Custom Size Range » (Plage de taille personnalisée) est réglée sur 98 pb (pour Start [Début]) et 600 pb (pour End [Fin]).

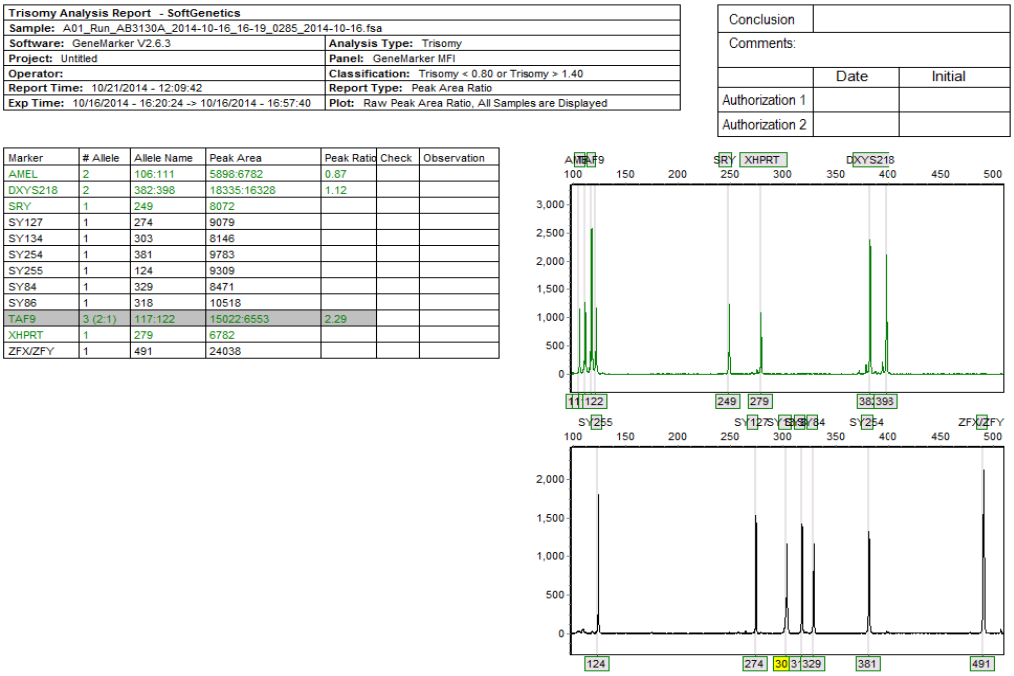
Figure 22 : Trisomy Print Settings Window (Fenêtre des paramètres d'impression de trisomie).



Afficher l'aperçu du compte-rendu GeneMarker

Cliquer « **Preview** » (Aperçu) pour afficher le compte-rendu Genemarker (figure 23). À partir de cette fenêtre, l'utilisateur peut examiner et imprimer les données de pic de chaque échantillon pour tous les marqueurs, pour créer un compte-rendu d'échantillon simple d'une ou deux pages.

Figure 23 : Compte-rendu GeneMarker



Trisomy Analysis Report - SoftGenetics

Sample: A01_Run_AB3130A_2014-10-16_16-19_0285_2014-10-16.fsa	
Software: GeneMarker V2.6.3	**Analysis Type:** Trisomy
Project: Untitled	**Panel:** GeneMarker MFI
Operator:	**Classification:** Trisomy < 0.80 or Trisomy > 1.40
Report Time: 10/21/2014 - 12:09:42	**Report Type:** Peak Area Ratio
Exp Time: 10/16/2014 - 16:20:24 -> 10/16/2014 - 16:57:40	**Plot:** Raw Peak Area Ratio, All Samples are Displayed

Conclusion		
Comments:		
	Date	Initial
Authorization 1		
Authorization 2		

Marker	# Allele	Allele Name	Peak Area	Peak Ratio	Check	Observation
AMEL	2	106:111	5898:6782	0.87		
DXYS218	2	382:398	18335:16328	1.12		
SRY	1	249	8072			
SY127	1	274	9079			
SY134	1	303	8146			
SY254	1	381	9783			
SY255	1	124	9309			
SY84	1	329	8471			
SY86	1	318	10518			
TAF9	3 (2:1)	117:122	15022:6553	2.29		
XHPRT	1	279	6782			
ZFX/ZFY	1	491	24038			

Le compte-rendu GeneMarker comprend les caractéristiques suivantes :

- En-tête de compte-rendu : comporte les informations sur l'analyse, le projet, l'échantillon et les paramètres.
- Case de signature : emplacement pour la date et les initiales des examinateurs du compte-rendu.
- Électrophérogramme : comparable à la fenêtre d'analyse de trisomie, affiche toutes les couleurs de fluorochrome du tracé de l'échantillon.
- Tableau de compte-rendu : affiche les valeurs sélectionnées de pic et de marqueur pour l'échantillon en cours. Les dénominations de trisomie sont surlignées en gris. Une colonne supplémentaire de vérification est prévue pour les initiales de l'examinateur.
- Graphe de rapport corrigé : contient tous les points de graphe de l'ensemble de données pour tous les marqueurs dans la couleur de fluorochrome. Les symboles représentent différents marqueurs et peuvent être déchiffrés à partir de la ligne « Symbol » (Symbole) dans « Report Table » (Tableau de compte-rendu). Les symboles jaunes pleins représentent les points de données de l'échantillon actuel. Les symboles à liseré rouge représentent les dénominations de trisomie.

Remarque : *Le Corrected Ratio Plot (Graphe de rapport corrigé) apparaît sur la deuxième page pour chaque échantillon uniquement quand Ratio Plot (Graphe de rapport) est sélectionné dans la boîte de dialogue Trisomy Print Report Settings (Paramètres d'impression du compte-rendu de trisomie).*

ANNEXE 1 : Étiquettes des fluorochromes

Les marqueurs sont étiquetés comme suit :

Male Factor Infertility

NED	VIC
sY84	AMEL
sY86	TAF9L
sY127	SRY
sY134	XHPRT
sY254	DXYS218
sY255	
ZFX/ZFY	

MFI-Y*plus*

6-FAM
SY82
SY83
SY88
SY105
SY121
SY143
SY153
SY160
SY1182
SY1191
SY1291

ANNEXE 2 : - Tableau de l'emplacement du marqueur, hétérozygotie observée, plage de taille d'allèle

Male Factor Infertility

Marqueur	Emplacement	Hétérozygotie observée*	Plage de segment (pb)	Couleur du fluorochrome de marquage
AMEL	Xp22.22/Yp11.2	s.o.	102,5/112,5	vert
TAF9	3p24.2/Xq21.1	s.o.	113/122,5	vert
SRY	Yp11.31	s.o.	240-252,5	vert
XHPRT	Xq26.2	0,72	260,5-304,5	vert
DXYS218	Xp22.32/Yp11.3	0,74	367,5-402,5	vert
SY84	Yq11.1 (221)	s.o.	323-333	jaune
SY86	Yq11.21 (221)	s.o.	312-322	jaune
SY127	Yq11.223	s.o.	267-277	jaune
SY134	Yq11.223	s.o.	297-308	jaune
SY254	Yq11.23 (223)	s.o.	375-386	jaune
SY255	Yq11.23 (223)	s.o.	118-128	jaune
ZFX/Y	Xp22.11/Yp11.2	s.o.	485-495	jaune

MFI-Y*plus*

Marqueur	Emplacement	Plage de segment (pb)	Couleur du fluorochrome de marquage
SY82	Yq11.21	260-268	bleu
SY83	Yq11.21	270-280	bleu
SY88	Yq11.221	118-128	bleu
SY105	Yq11.222	291-305	bleu
SY121	Yq11.222	180-200	bleu
SY143	Yq11.223	305,5-315	bleu
SY153	Yq11.223-Yq11.23	134-144	bleu
SY160	Yq12	231-241	bleu
SY1182	Yq11.221	242-252	bleu
SY1191	Yq11.223	375-395	bleu
SY1291	Yq11.223	517-537	bleu

***Les hétérozygoties observées sont basées sur un nombre d'allèles observés avec le panel de validation de Elucigene Diagnostics. Ces chiffres peuvent donc être différents des données publiées et peuvent aussi varier selon la population testée.**

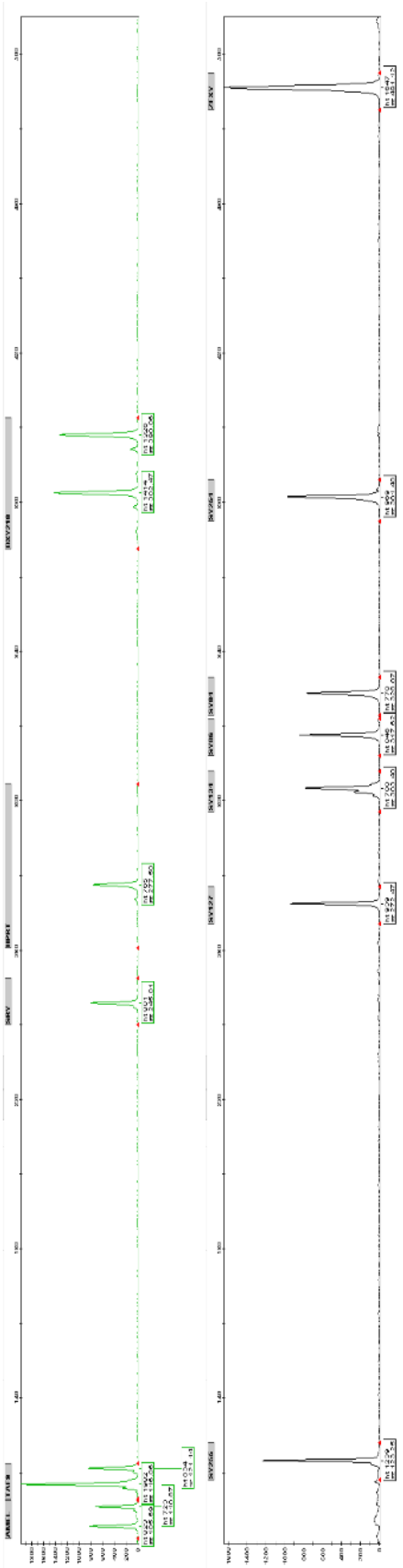
Localisation des marqueurs STS de microdélétion du chromosome Y utilisés pour les produits Male Factor Infertility

Région	Marqueur STS	début STS	fin STS
AZFa	SY82		
AZFa	SY84		
AZFa	SY86		
AZFa	SY1182		
AZFa	SY88		
AZFb	SY105		
AZFb	SY121		
AZFb	SY127		
AZFb	SY134		
AZFb	SY143		
AZFc gr/gr	SY1191		
AZFb	SY153		
AZFc	SY254		
AZFc	SY254		
AZFc	SY254		
AZFc	SY254		
AZFc gr/gr	SY1291		
AZFb	SY153		
AZFc	SY254		
AZFc	SY254		
AZFc	SY254		
Terminal	SY160		

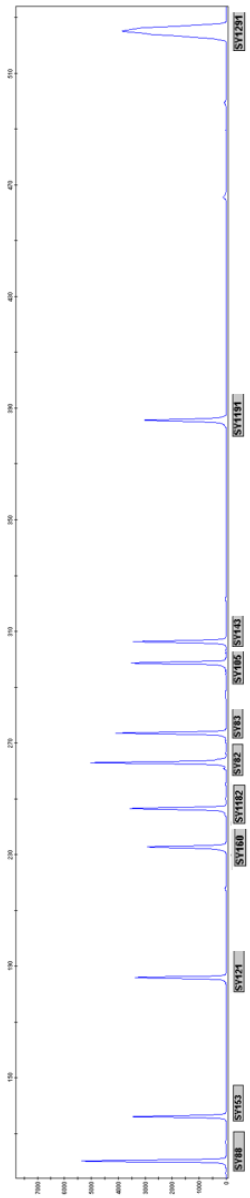
Les coordonnées du génome ont été extraites de MSY Breakpoint Mapper (breakpointmapper.wi.mit.edu) basées sur NCBI Build 38

ANNEXE 3 : Profil GeneMapper

Profil GeneMapper pour un homme normal montrant les positions relatives des marqueurs détectés par Male Factor Infertility.



Profil GeneMapper pour un homme normal montrant les positions relatives des marqueurs détectés par MFI-Y *plus*.



Caractéristiques des performances

Validation interne

24 échantillons d'ADN (extraits du sang total) ont été testés à l'aveugle en utilisant l'essai Elucigene Male Factor Infertility. 1 échantillonnage n'a pas réussi à amplifier, ceci étant dû à une faible concentration et mauvaise qualité d'ADN. Sur les échantillons ayant produit des résultats interprétables, 9 étaient normaux, 2 présentaient une microdélétion dans la région AZFa, 6 des microdélétions AZFc et 6 montraient des délétions plus étendues affectant à la fois AZFb et AZFc (AZFbc). Tous les résultats analysables ont montré une spécificité et une sensibilité de 100 % avec les résultats obtenus précédemment par une méthode alternative établie.

L'analyse approfondie avec l'essai Elucigene MFI-Y*plus* a confirmé la présence de ces microdélétions Y. Elle a également détecté un certain nombre de sous-délétions, à savoir des délétions gr/gr (AZFc partielles) dans deux échantillons de type sauvage, une délétion AZFa partielle dans un échantillon AZFbc et une perte du marqueur SY160 terminal dans 5 échantillons AZFbc indiquant une délétion terminale Yq plus étendue.

Validation externe

25 échantillons ont été testés sur un site externe avec Elucigene Male Factor Infertility. 20 de ces échantillons provenaient de patients masculins. Sur ces échantillons, 12 ont été identifiés comme étant de type sauvage pour la microdélétion du chromosome Y, 2 positifs pour des microdélétions AZFa, 1 pour AZFb, 3 pour AZFbc et 1 pour une microdélétion AZFabc. Tous les résultats ont montré 100 % de spécificité et de sensibilité avec des résultats précédemment obtenus via une autre méthode établie.

Un échantillon semblait démontrer une perte de pic SY86 (marqueur de région AZFa) tout en présentant 2 pics dans le marqueur SY134 (marqueur de région AZFb). Ce résultat est vraisemblablement la conséquence d'une délétion mineure (environ 19 pb) affectant l'amplicon SY86, entraînant une migration de ce produit PCR vers le segment de marqueur voisin SY134 sur l'électrophorèse capillaire (voir le Guide d'analyse apparoprié pour obtenir un exemple).

Limites de la procédure

Ce test est conçu pour détecter les aneuploïdies des chromosomes sexuels ainsi que les délétions spécifiques du chromosome X comme le décrit en détail le mode d'emploi. Il peut ne pas détecter les réorganisations structurelles impliquant les chromosomes testés et ne détectera pas les anomalies dans d'autres chromosomes. Il est possible que le mosaïcisme ne soit pas détecté pour les chromosomes testés.

Remarque : *Les hétérozygoties des marqueurs utilisés ont été dérivés d'un ensemble d'échantillons au hasard soumis pour des analyses de routine et provenant d'une population principalement blanche d'Europe du nord. Tous les calculs effectués en utilisant ces hétérozygoties s'appliquent strictement à la population dont proviennent les échantillons. Une petite étude utilisant des échantillons dérivés localement peut être réalisée dans le cadre d'une étude de validation pour établir les hétérozygoties dans la population à tester. Il n'est pas attendu que les variations de population modifient significativement la valeur informative globale du test.*

Plus de détails sur les produits Elucigene sont disponibles à l'adresse :

http://www.elucigene.com

Références

1. Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Medical Journal 2009 Apr;50(4): 336-47
2. Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tuttelmann F, European Academy of Andrology, European Molecular Genetics Quality Network. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. Andrologie. 2014 Jan;2(1):5-19
3. Mansfield E S. Diagnosis of Down syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphisms. Human Molecular Genetics 1993 2(1): 43-50
4. Mann K, Fox SP, Abbs SJ, Yau SC, Scriven PN, Docherty Z, Mackie Ogilvie C. Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Service and implications for the future of prenatal diagnosis. The Lancet 2001 358 (9287): 1057-1061
5. Mann K, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mackie Ogilvie C. Strategies for the rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidy. European Journal of Human Genetics 2004 12: 907-915
6. Mackie Ogilvie C, Donaghue C, Fox SP, Docherty Z, Mann K. Rapid prenatal diagnosis of an aneuploidy using Quantitative Fluorescence-PCR (QF-PCR). Journal of Histochemistry and Cytochemistry 2005 53(3): 285-288
7. Deutsch S, Choudhury U, Merla G, Howald C, Sylvan A, Antonarakis SE. Detection of aneuploidies by paralogous sequence quantification. Journal of Medical Genetics 2004 41: 908-915
8. Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. International Journal of Andrology 2004 27:240-9
9. Satsangi J et al. Effect of heparin on polymerase chain reaction. Lancet 343:1509-1510 (1994).
10. PCR Primer: A Laboratory Manual, 2nd edition. ColdSpring Harbour Laboratory Press: Section 1

Elucigene est une marque commerciale de Delta Diagnostics (UK) Ltd.

QIAAMP est une marque commerciale de Qiagen Gmbh. GENEMARKER est une marque commerciale de Softgenetics Corporation. GENEMAPPER, GENESCAN, NED, VIC, PET, POP-7, LIZ et HI-DI sont des marques commerciales de Life Technologies Corporation.

Avis à l'acheteur : Licence limitée

Ce produit est vendu conformément à un accord avec Life Technologies Corporation. L'achat de ce produit confère à l'acheteur le droit non transférable d'utiliser uniquement la quantité de produit et les composants achetés seulement pour le diagnostic in vitro humain, et uniquement dans le cadre de l'indication clinique décrite dans les modes d'emploi. De plus amples informations sur l'obtention des droits d'utilisation de ce produit ou ses composants peuvent être obtenues en contactant outlicensing@lifetech.com.

Copyright © 2015 Delta Diagnostics (UK) Ltd.